BIOSCIENCES ET TECHNIQUES

collection dirigée par J. Figarella, F. Zonszain

Biochimie structurale



Cl. Audigié†
F. Zonszain†

doin

Chez le même éditeur

Analyses biologiques, sujets de BTS corrigés
J. Allay, M. Charrin, C. Plas, M. Rivière, P. Vanneste, S. Vanneste

Biochimie métabolique
Cl. Audigié, F. Zonszain, 3e édition

Principes des méthodes d'analyse biochimique
Cl. Audigié, G. Dupont, F. Zonszain
Tome 1, 2e édition
Tome 2, 2e édition

Exercices de biochimie
F. Lafont, C. Plas, P. Cazaubon, 2e édition

Biotechnologies. Principes et méthodes
M. Larpent-Gourgaud, J.-J. Sanglier

Génie enzymatique. Travaux pratiques
D. Loncle

Génie génétique
D. Loncle, M. Amaudric, C. Jacoty

Manipulations d'analyse biochimique
M. Gavrilovic, M.-J. Maginot, Cl. Schwartz-Gavrilovic, J. Wallach
3e édition revue et corrigée

Précis de physiologie
A. Calas, J.-F. Perrin, C. Plas, P. Vanneste

Expériences faciles et moins faciles en sciences biologiques
R. Perrier, T. Auffret van der Kemp, F. Zonszain

Éléments de biologie cellulaire
D. Robert, B. Vian, 3e édition, 2004

Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés
A. Meyer, J. Deiana, A. Bernard, 2e édition, 2004

Microbiologie et toxicologie des aliments
G. Leyral, E. Vierling

Microbiologie et qualité dans les industries agro-alimentaires
G. Bonnefoy, F. Guillet, G. Leyral, F. Verne

Travaux dirigés de biochimie, biologie moléculaire et bioinformatique
G. Coulouly, E. Klein, E. Barbieri, M. Kriat



BIOSCIENCES ET TECHNIQUES

Collection dirigée par J. Figarella, F. Zonszain

Biochimie structurale

Nouvelle édition

Claude Audigié †

Inspecteur général de l'Education nationale

François Zonszain †

Professeur agrégé – ENCPB, Paris

doin éditeurs - paris



Nous remercions M. **Gérard DUPONT**, professeur agrégé à l'École nationale de Chimie, Physique et Biologie, pour l'aide précieuse qu'il nous a apportée en relisant les pages de cet ouvrage consacrées à la chimie.

DOIN ÉDITEURS
Wolters Kluwer France
1, rue Eugène et Armand Peugeot
92856 Rueil-Malmaison Cedex

ISBN 2-7040-0655-5

TABLE DES MATIÈRES

Chapitre 1 *COMPOSITION ÉLÉMENTAIRE DES ÊTRES VIVANTS*

Chapitre 2 *LES CONSTITUANTS MINÉRAUX*

Chapitre 3 *GÉNÉRALITÉS SUR LES CONSTITUANTS ORGANIQUES*

Chapitre 4 *LES PROTIDES*

Chapitre 5 *LES GLUCIDES*

Chapitre 6 *LES ACIDES NUCLÉIQUES*

Chapitre 7 *LES LIPIDES*

1
Composition élémentaire des êtres vivants

La détermination des éléments constitutifs de la matière vivante, premier pas dans la connaissance de sa structure chimique, relève de l'analyse élémentaire qualitative et quantitative dont les opérations sont généralement réalisées en deux temps.

Le premier a pour but de détruire les structures organiques covalentes pour amener les éléments à l'état de combinaisons ionisables. C'est une *minéralisation*, réalisée par voie sèche ou par voie humide : minéralisation en présence d'oxyde cuivrique anhydre et d'oxygène, incinérations, minéralisations sulfurique, sulfo-nitrique, perchlorique, etc.

Le second consiste à caractériser puis à doser les composés minéraux formés.

Pour de nombreux éléments qui ne sont présents dans la matière vivante qu'à l'état de traces, ce deuxième temps nécessite l'utilisation de techniques analytiques, sensibles et spécifiques, généralement instrumentales (colorimétrie, spectrophotométrie d'émission atomique, spectrophotométrie d'absorption atomique).

I. LA RÉPARTITION DES ÉLÉMENTS DANS LA MATIÈRE VIVANTE

A titre d'exemple, le tableau I (voir p. 2) présente la répartition quantitative des principaux éléments dans un organisme végétal, la luzerne, et dans un organisme animal, le corps humain, ainsi que des comparaisons avec le monde inerte environnant (lithosphère + atmosphère + hydrosphère).

L'examen de ce tableau permet de dégager certaines conclusions :

— Les éléments de la matière vivante sont ceux du monde inerte, mais seuls les plus légers sont bien représentés et leur répartition est très différente de leur distribution dans le monde environnant.

Les quatre éléments C, H, O, N, représentent environ 95 % de la matière vivante alors que les éléments O, Si, Al représentent plus de 80 %, C moins de 1 % et N environ 0,03 % du monde inerte.

— Les éléments présents peuvent être répartis en deux groupes. Les onze éléments : C, H, O, N, S, P, Cl, Na, K, Ca, Mg qui constituent plus de 99 % des organismes sont qualifiés d'*éléments majeurs ou macro-éléments* ou encore d'*éléments plastiques* car ils participent à la construction des êtres vivants. Les autres éléments,

tels Fe, I, Zn, Mn, etc, que la matière vivante renferme de façon permanente, mais seulement à l'état de traces, sont les *oligoéléments,* dont le rôle est essentiellement catalytique.

Tableau I. Composition élémentaire de la matière vivante.

Eléments	Matière vivante animale (corps humain) (grammes par 100 g) (%)	Matière vivante végétale (luzerne entière fraîche) (%)	Lithosphère + hydrosphère + atmosphère (%)
O	62,81	77,30	50
C	19,37	11,30	0,2
H	9,31	9,53	1
N	5,14	0,825	0,03
S	0,64	0,108	0,1
P	0,63	0,706	0,1
Cl	0,18	0,07	0,2
Na	0,26	0,039	2,4
K	0,22	0,226	2,3
Ca	1,38	0,58	3,2
Mg	0,04	0,08	2
F	0,009	—	0,1
Fe	0,005	0,002 7	4
Si	0,004	0,009 3	25,8
Zn	0,002 5	0,000 35	
Al	0,001	0,002 5	7,3
Cu	0,000 4	0,000 25	
Mn	0,000 1	0,000 36	0,08
I	0,000 1	0,000 002	

II. LES ÉLÉMENTS MAJEURS

A. Caractéristiques générales et répartition

1. LES ÉLÉMENTS CARBONE, HYDROGÈNE, OXYGÈNE, AZOTE

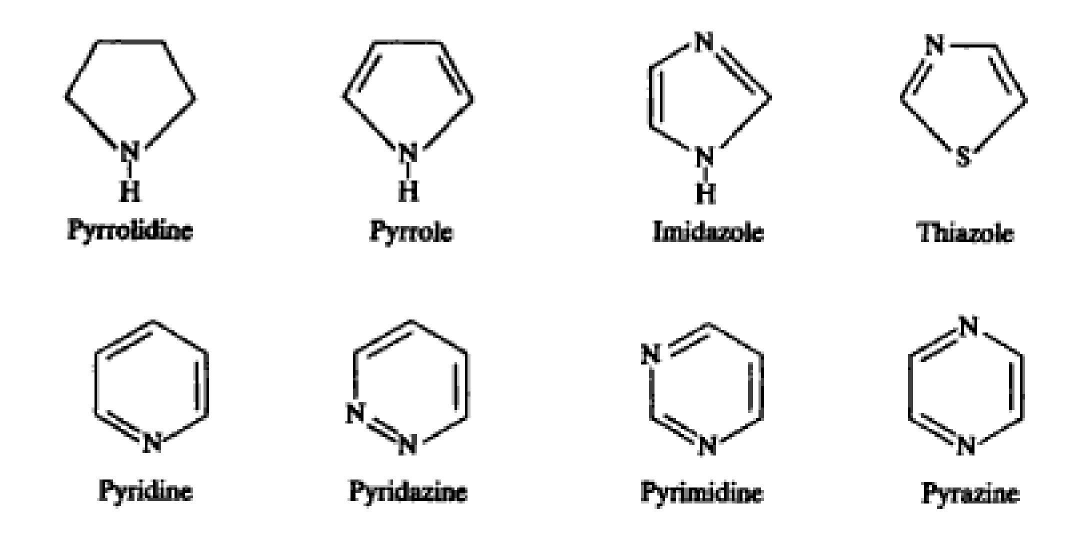
Le carbone est l'élément le plus abondant de la matière sèche (environ 50 %) et son taux est en général plus élevé dans les tissus animaux que dans les tissus végétaux. La primauté du carbone tient à sa structure électronique (p. 7) qui lui permet de

s'unir indéfiniment à lui-même, pour constituer des chaînes, des cycles ou des réseaux qui sont les bases architecturales de la matière vivante, et de s'unir aux éléments H, O, N pour former des groupements fonctionnels dont l'assemblage conduit à une infinité de composés : les constituants organiques.

Le carbone est également essentiel sous forme minérale ; le dioxyde de carbone (ou ses dérivés HCO_3^- et CO_3^{2-}) est non seulement l'un des termes des réactions de dégradation, mais également le point de départ de synthèses, de matière inerte ou vivante, utilisé par de nombreux organismes. Dans l'atmosphère (0,03 % en volume) il représente une réserve qui tamponne les variations des échanges entre les êtres vivants.

L'hydrogène et l'oxygène sont abondants par l'intermédiaire de leur combinaison : *l'eau*. De plus, ces deux éléments se retrouvent associés dans presque tous les composés organiques. Il en résulte que l'oxygène, compte tenu de sa masse atomique, est l'élément le plus abondant de la matière vivante non déshydratée (60 % et plus). Par contre l'hydrogène est l'élément le mieux représenté. Ainsi 100 atomes d'hydrogène correspondent à environ 50 à 60 atomes de carbone et à environ 25 atomes d'oxygène.

L'azote, quatrième élément essentiel, est peut-être le plus caractéristique des êtres vivants, chez lesquels il constitue les principales structures. Son taux, qui demeure cependant de valeur très moyenne (1 à 5 %), est plus élevé dans les tissus animaux que dans les tissus végétaux riches en substances hydrocarbonées. *L'azote moléculaire* N_2, peu réactif, ne participe guère aux processus biologiques sauf chez les bactéries fixatrices d'azote, symbiotiques ou non (genres *Rhizobium, Clostridium, Azotobacter,* etc.). Il en est de même de ses dérivés oxygénés, là encore avec des exceptions (bactéries de la nitrification, bactéries dénitrifiantes, premiers stades du métabolisme azoté des végétaux). Ce sont les dérivés réduits hydrogénés *(amines, imines, amides)* et les *hétérocycles azotés* qui présentent le plus d'intérêt en biochimie.



L'étude des combinaisons organiques de ces quatre éléments constitue la partie essentielle de la biochimie structurale.

2. LES ÉLÉMENTS SOUFRE ET PHOSPHORE

Le soufre et le phosphore sont universellement répandus. Ils sont présents à la fois sous forme de sels minéraux et sous forme de combinaisons organiques, la distinction devenant parfois difficile.

a. Le phosphore

La teneur chez les végétaux varie selon les espèces, les organes et les sols : abondant dans les graines, en particulier dans les céréales (écorce et germe), le phosphore est en quantité assez faible dans les feuilles. Chez les animaux, cet élément à l'état de phosphate calcique constitue la plus grande partie du squelette des Vertébrés, mais c'est également sous forme de sels solubles et de combinaisons organiques un constituant des cellules et des humeurs.

Préparé la première fois à partir de l'urine, puis des os, cet élément présente un intérêt biochimique tout particulier par ses dérivés. L'intervention des *composés phosphorés solubles* dans les processus biologiques correspond pratiquement aux trois quarts du domaine biochimique. Ces composés dérivent du pentaoxyde de phosphore P_2O_5 et à aucun moment ils ne subissent des phénomènes d'oxydo-réduction. Les plus importants sont liés à l'acide orthophosphorique H_3PO_4; cependant les dérivés de l'acide métaphosphorique HPO_3 sont présents chez les bactéries. Ce sont :

— ***Les o-phosphates*** - Les trois acidités de l'acide o-phosphorique sont de forces très différentes (1) $\left(pK_1\ 2,\ pK_2\ 6{,}8,\ pK_3\ 11{,}7\right)$ et se manifestent successivement $(\Delta pK > 4)$. La première acidité, forte, ne présente guère d'intérêt car elle est toujours dissociée dans le domaine de pH compatible avec la vie. La seconde est faible et constitue avec les bases fortes un *système tampon* (p. 34) important : mono et dihydrogénophosphate

$$H_2PO_4^- \rightleftharpoons HPO_4^{2-} + H^+$$

La troisième acidité, très faible, toujours libre, intervient dans les associations de molécules d'acide phosphorique entre elles ou avec des composés organiques. Les produits ainsi formés sont donc fortement acides, souvent même légèrement plus que l'acide phosphorique lui-même (pK plus faibles) et la combinaison ou la mise en liberté de cette troisème fonction acide n'entraîne pas de variations importantes du pH.

— ***Les polyphosphates*** - Ils résultent de la condensation avec élimination d'eau de plusieurs molécules d'acide o-phosphorique.

Exemples : *Diphosphate ou pyrophosphate* et ses dérivés (esters).

$$\begin{array}{ccccc} O^- & & & & O^- \\ & \diagdown & & \diagup & \\ O{=}P & - & O & - & P{=}O \\ & \diagup & & \diagdown & \\ O^- & & & & O^- \end{array}$$

(1) La justification de ces notions est développée à propos de l'ionisation des amino-acides.

Pour simplifier l'écriture, le groupement : $-P(=O)(O^-)_2$

sera ultérieurement représenté par le symbole Ⓟ en négligeant l'ionisation. Le pyrophosphate correspond alors à la formule schématique Ⓟ—O—Ⓟ ou plus simplement Ⓟ—Ⓟ.

Triphosphate et ses dérivés

$$O{=}P(O^-)_2{-}O{-}P(O^-)(=O){-}O{-}P(O^-)_2{=}O$$

qui, avec une approximation supplémentaire, peuvent être schématisés

Ⓟ—O—Ⓟ—O—Ⓟ ou Ⓟ—Ⓟ—Ⓟ

— ***Les dérivés organiques*** de l'acide phosphorique, comprenant :

• **Des esters** - Monoesters, le plus souvent de fonction alcool primaire.

$R{-}CH_2O{-}$Ⓟ ou R—O—Ⓟ

— Diesters - L'acide phosphorique, qui ne conserve plus alors que son acidité la plus forte sert de trait d'union à deux groupements organiques et participe ainsi à la structure du composé.

R—O—Ⓟ—O—R′

— Les triesters, toxiques, ne sont pas rencontrés à l'état naturel.

• **Des esters phosphoriques d'énols ou énolphosphates**

$R{-}C(=CH_2){-}O{-}$Ⓟ

• **Des anhydrides mixtes** d'acide phosphorique et d'acide carboxylique ou **acylphosphates**

$R{-}C(=O){-}O{-}$Ⓟ

• **Des amidine-phosphates**

$R{-}C(=NH){-}NH{-}$Ⓟ

Parmi ces composés (acides polyphosphoriques, dérivés organiques) certains présentent une propriété remarquable. L'hydrolyse de leur liaison phosphate s'accompagne de la libération d'une quantité importante d'énergie, 30 kJ/mol et plus. C'est une *liaison à haut potentiel d'hydrolyse* (à enthalpie libre d'hydrolyse fortement négative) et le composé est qualifié de ***« composé riche en énergie »***. Cette notion,

qui sera développée lors de l'étude du métabolisme, est d'une importance fondamentale en biochimie.

L'acide o-phosphorique possède donc dans l'organisme une fonction triple : *plastique* (phosphate calcique), *structurale* (liaison diester), *énergétique* (composés riches en énergie). De plus il tamponne le milieu cellulaire.

b. Le soufre

Il est plus abondant chez les animaux que chez les végétaux dans lesquels toutefois sa teneur peut égaler et même dépasser celle du phosphore.

• **Le soufre minéral** existe à l'état libre chez certaines bactéries : bactéries sulfureuses pigmentées (Thiorhodobactériacées, Chlorobactériacées) ou incolores (Thioleucobactériacées). A l'état combiné on le rencontre sous différentes formes chez les êtres vivants :

— sulfure d'hydrogène (bactéries sulfureuses et produits de fermentations anaérobies) ;

— thiosulfate (bactéries, traces dans l'urine) ;

— sulfate (forme la plus abondante du soufre minéral) ;

— thiocyanate (dans certaines sécrétions, salive par exemple).

• **Le soufre organique** se présente sous des formes très diverses. Les *thiols* ou *mercaptans R—SH*, les *sulfures* R—S—R′ et les *disulfures* R—S—S—R′, facilement convertibles les uns dans les autres, sont fréquents dans les composés protéiques qui renferment la fraction la plus importante du soufre organique. Les *esters sulfuriques* HSO_3—O—R correspondent à l'état du soufre glucidique et lipidique, ainsi qu'à une forme d'élimination urinaire de diverses substances toxiques ou physiologiques. Dans ce dernier cas, l'estérification prend alors le nom de *sulfo-conjugaison.* D'autres formes moins répandues existent chez les végétaux et constituent, en particulier, les produits odoriférants d'essences végétales (moutarde, giroflée, ail, etc.).

Les autres éléments majeurs, Cl, Na, K, Ca et Mg, présents dans la matière vivante sous forme minérale essentiellement, seront étudiés avec les constituants minéraux.

B. Liaisons entre les éléments

Les diverses molécules qui constituent pondéralement l'essentiel de la matière vivante résultent de l'assemblage des atomes des éléments précédemment étudiés. Il est donc nécessaire de préciser certaines données relatives à leurs modes de liaison. Ces données ne s'appliquent pas seulement à ces six éléments, mais, pour simplifier et limiter les développements, c'est avant tout à propos de ceux-ci et en particulier des éléments C, H, O et N, que seront explicitées ces notions.

1. LA CONFIGURATION ÉLECTRONIQUE DES ÉLÉMENTS

Bien qu'indiscernables les uns des autres, les électrons sont répartis dans l'espace périnucléaire de chaque atome selon un ordre défini en fonction de leur état énergétique

caractérisé par quatre *nombres quantiques :* nombre quantique principal *n*, nombre quantique secondaire ou azimutal *l*, nombre quantique magnétique *m*, qui ne peuvent prendre que des valeurs entières bien précises, enfin nombre quantique de spin *s* qui est égal à + ou − 1/2.

La répartition des électrons autour du noyau, appelée *configuration électronique de l'élément,* peut ainsi être représentée à l'aide de couches (K, L, M, N...), de sous-couches (s, p, d, f) et de cases, chacune correspondant à un niveau énergétique précis et stationnaire.

Elément	Numéro atomique	Couche K	Couche L		Couche M		
		1 s	2 s	2 p	3 s	3 p	3 d
H	1	[↑]					
C	6	[↑↓]	[↑↓]	[↑][↑][ ]			
N	7	[↑↓]	[↑↓]	[↑][↑][↑]			
O	8	[↑↓]	[↑↓]	[↑↓][↑][↑]			
S	16	[↑↓]	[↑↓]	[↑↓][↑↓][↑↓]	[↑↓]	[↑↓][↑][↑]	

Cette stratification dans la répartition résulte du fait que les niveaux énergétiques qui sont susceptibles d'être occupés par un électron ne sont pas quelconques et continus mais constituent une série discontinue. On dit qu'ils sont quantifiés et les échanges d'énergie entre des électrons et le milieu extérieur ne peuvent se faire que par quanta d'énergie qui sont des multiples entiers du quantum caractéristique d'un électron dans un élément donné.

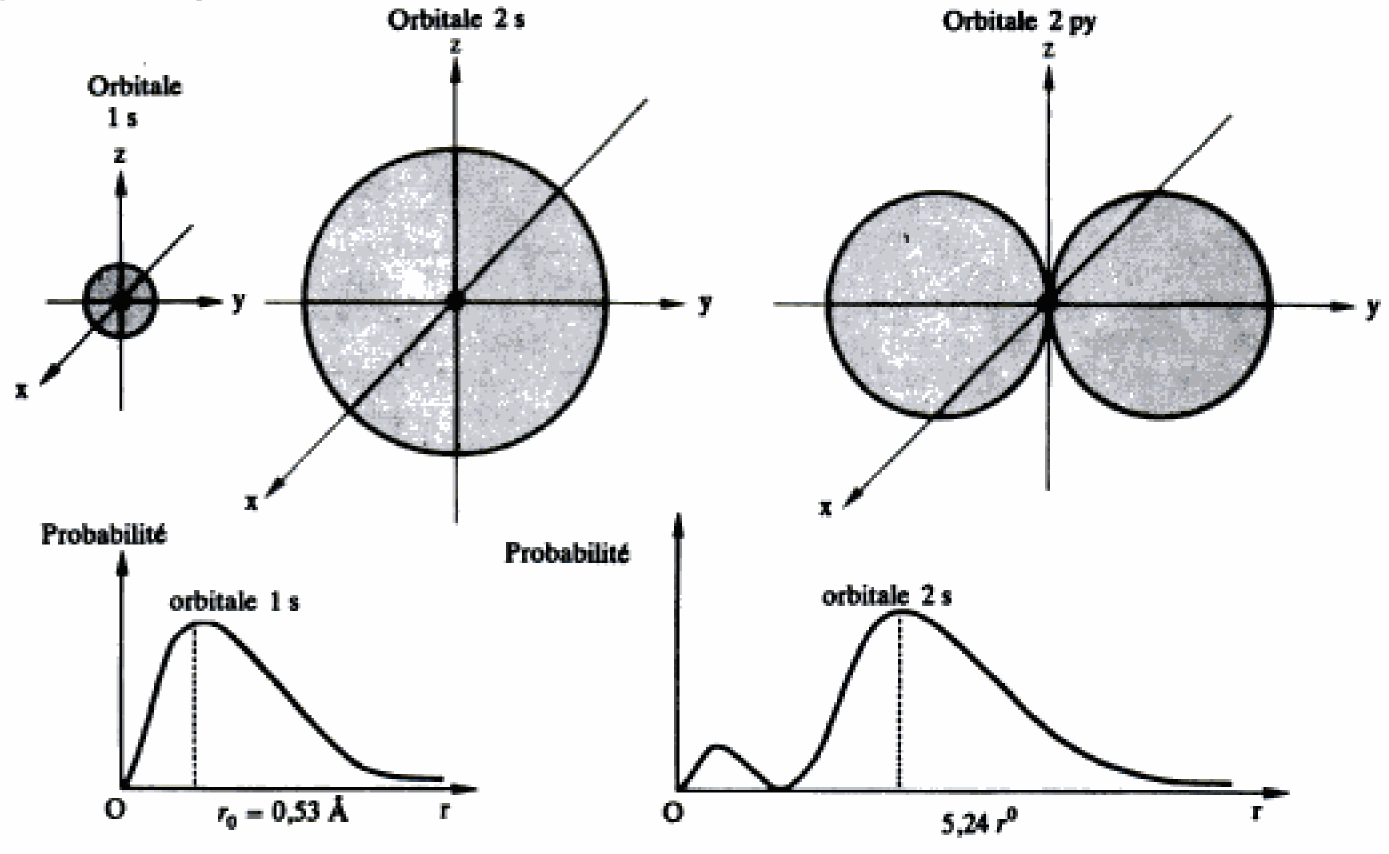
De même, les échanges énergétiques des atomes, gains ou pertes, sont quantifiés. Un atome est dans son *état fondamental* lorsqu'il n'a emmagasiné aucun quantum d'énergie. Cet état d'énergie minimum est stable. Au contraire les *états excités*, qui correspondent à un gain d'énergie, par l'atome, en liaison avec un remaniement de la configuration électronique, sont instables, de durée de vie très brève. Le retour à l'état fondamental stable s'accompagne d'une restitution de l'énergie.

2. LES ORBITALES ATOMIQUES

Dans un atome, chaque électron, bien que ponctuel, est en fait équivalent à un « *nuage électronique* » dont la répartition dans l'espace est déterminée statistiquement par une fonction mathématique appelée *fonction d'onde* qui dépend du temps. Chaque électron peut donc théoriquement occuper tout l'espace entourant le noyau, avec une probabilité de présence plus ou moins grande (fig. 1.1).

Si l'on élimine les zones de faible probabilité de présence pour se limiter à l'espace dans lequel la probabilité de présence est par exemple de 95 %, les calculs





b) Orbitales p d'un atome polyélectronique

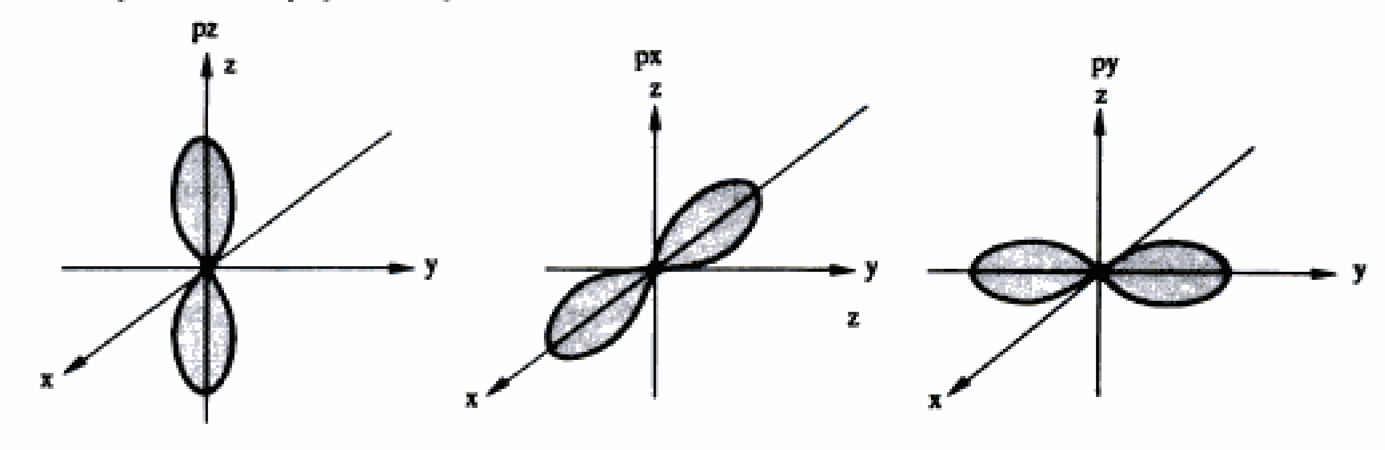


Figure 1.1 Orbitales atomiques.

permettent de déterminer pour l'électron considéré un volume continu appelé *orbitale atomique* (fig. 1.1).

Chaque orbitale possède un niveau énergétique défini, qui croît au fur et à mesure que l'on s'éloigne du noyau et dépend des trois nombres quantiques *n*, *l* et *m*. Sa forme est liée essentiellement au nombre quantique secondaire *l* et l'on parle donc d'orbitales s ($l = 0$), d'orbitales p ($l = 1$), d'orbitales d ($l = 2$), etc.

Toute orbitale peut contenir au maximun deux électrons de spins opposés. Si un seul électron est présent, il est dit *célibataire* et il y a alors possibilité de couplage

avec un second électron de spin opposé pour former une *paire* ou *doublet*. Si l'orbitale n'est pas pourvue d'électron, elle est déclarée *vacante*.

L'orbitale est donc l'équivalent dans l'espace de la case citée précédemment, sa forme et ses dimensions dépendent de la série (s, p, d) et de l'atome envisagé (H, C, O...).

— ***Cas de l'atome d'hydrogène*** - C'est le cas le plus simple puisqu'il n'y a qu'un seul électron (fig. 1.1).

• **Les orbitales** s ($n = 1$, $l = 0$, $m = 0$) sont représentées par des sphères concentriques centrées sur le noyau et dont le rayon varie sensiblement comme n^2. Lorsque l'atome est dans son état fondamental l'électron occupe l'orbitale 1 s, les autres orbitales, 2 s, 3 s mais aussi 2 p, etc. ne sont occupées que dans les états excités.

• **Les orbitales p** ($n = 2$, $l = 1$, $m = -1$, 0 ou 1) sont au nombre de trois correspondant aux trois valeurs de m. Chacune est constituée par deux sphères de même rayon, tangentes à l'origine, centrées sur les axes d'un trièdre trirectangle et dirigées suivant les trois axes. Elles possèdent donc un caractère directionnel (fig. 1.1).

• **Les orbitales d'ordre supérieur d, f,** ne seront pas envisagées ici.

— ***Cas des atomes polyélectroniques*** (C, N, O, etc.).

Les calculs sont plus complexes et nécessitent des approximations car pour chaque électron il faut tenir compte de l'influence des autres électrons de l'atome.

• **Les orbitales** s conservent leur symétrie sphérique.

• **Les orbitales p** ne sont plus des sphères, mais des lobes plus ou moins étirés pour lesquels le caractère directionnel subsiste.

3. LA LIAISON COVALENTE

Il est habituel de considérer plusieurs types de liaisons chimiques : la liaison ionique ou électrovalente, la liaison covalente (covalence vraie et liaison donneur-accepteur) et la liaison métallique qui ne présente pas ici d'intérêt particulier. En fait cette classification est schématique et n'a qu'une portée limitée.

Dans tous les cas la liaison entre les atomes résulte d'une modification des configurations électroniques liée à un abaissement de l'énergie du système et par suite à une plus grande stabilité. Les forces de cohésion sont de nature électrostatique : forces d'attraction et forces de répulsion coulombiennes entre les différents électrons et les différents noyaux.

a. Définition et caractéristiques générales

L'étude sera limitée au cas général des liaisons à deux électrons en négligeant, par ailleurs, les effets dus aux atomes autres que ceux participant à la liaison.

La liaison covalente, dite encore homopolaire, est réalisée par la mise en commun entre deux atomes d'une paire d'électrons constituant le doublet de liaison. Elle correspond à la liaison chimique type et présente certaines caractéristiques :

— *Elle est dirigée*. La constitution du doublet de liaison à partir d'électrons périphériques célibataires des atomes se fait selon le principe du recouvrement maximum des orbitales atomiques participant à la liaison. Il y a donc orientation des

atomes ; de là l'origine de la structure spatiale des molécules dont l'étude constitue la *stéréochimie.* Le doublet de liaison se localise sur une *orbitale moléculaire* englobant les deux atomes dont les nuages électroniques sont interpénétrés. L'origine des électrons du doublet est indiscernable et celui-ci est partagé par les deux atomes.

— *Elle est spécifique.* En ce sens que ses caractéristiques géométriques et énergétiques ainsi que sa polarité dépendent de la nature des atomes qui la constituent (tableau II).

— *Elle donne lieu à un phénomène de saturation.* Chaque électron célibataire ne peut participer à la formation que d'un seul doublet.

— *Elle est fixe.* La longueur et l'énergie de chaque type de covalence sont définies et indépendantes du milieu (tableau II). C'est une *liaison forte,* stable (énergie de l'ordre de 200 à 400 kJ/mol).

Enfin, le nombre d'électrons célibataires qu'un atome peut mettre en commun pour constituer des doublets et acquérir une configuration stable de gaz rare représente sa *covalence* ou valence plus simplement. Ex. : 1 pour l'hydrogène ; 2 pour l'oxygène.

Tableau II. Caractéristiques des principales liaisons covalentes (1).

Liaison	Longueur (pm) (2)	Energie (kJ/mol)	Δ Electro-négativité des éléments	Polarité (moment de liaison) (D)
C — H	109	414	0,4	0,3
O — H	96	460	1,4	1,5
N — H	102	351	0,9	1,3
S — H	135	359	0,4	0,7
C — N	148,7	205	0,5	0,5
C — O	143	351	1	0,9
C = O	123	727	1	2,4
C — C	154,1	368	0	—
C = C	133,7	614	0	—
O — O	147	146	0	—

b. Liaison homoatomique ou homonucléaire

Dans ce cas, les deux atomes qui participent à la liaison sont identiques comme par exemple dans la molécule d'hydrogène H—H ou H_2.

La variation de l'énergie potentielle du système constitué par les deux atomes d'hydrogène (2 électrons + 2 protons) en fonction de la distance internucléaire

(1) Les valeurs données sont des moyennes car elles dépendent du composé envisagé (influence des autres liaisons).

(2) Un picomètre (pm) est égal à 10^{-12} m.

(fig. 1.2) permet de constater l'existence d'un minimum très accusé pour la valeur d = 74 pm, ce qui correspond à un équilibre stable pour l'édifice moléculaire H_2.

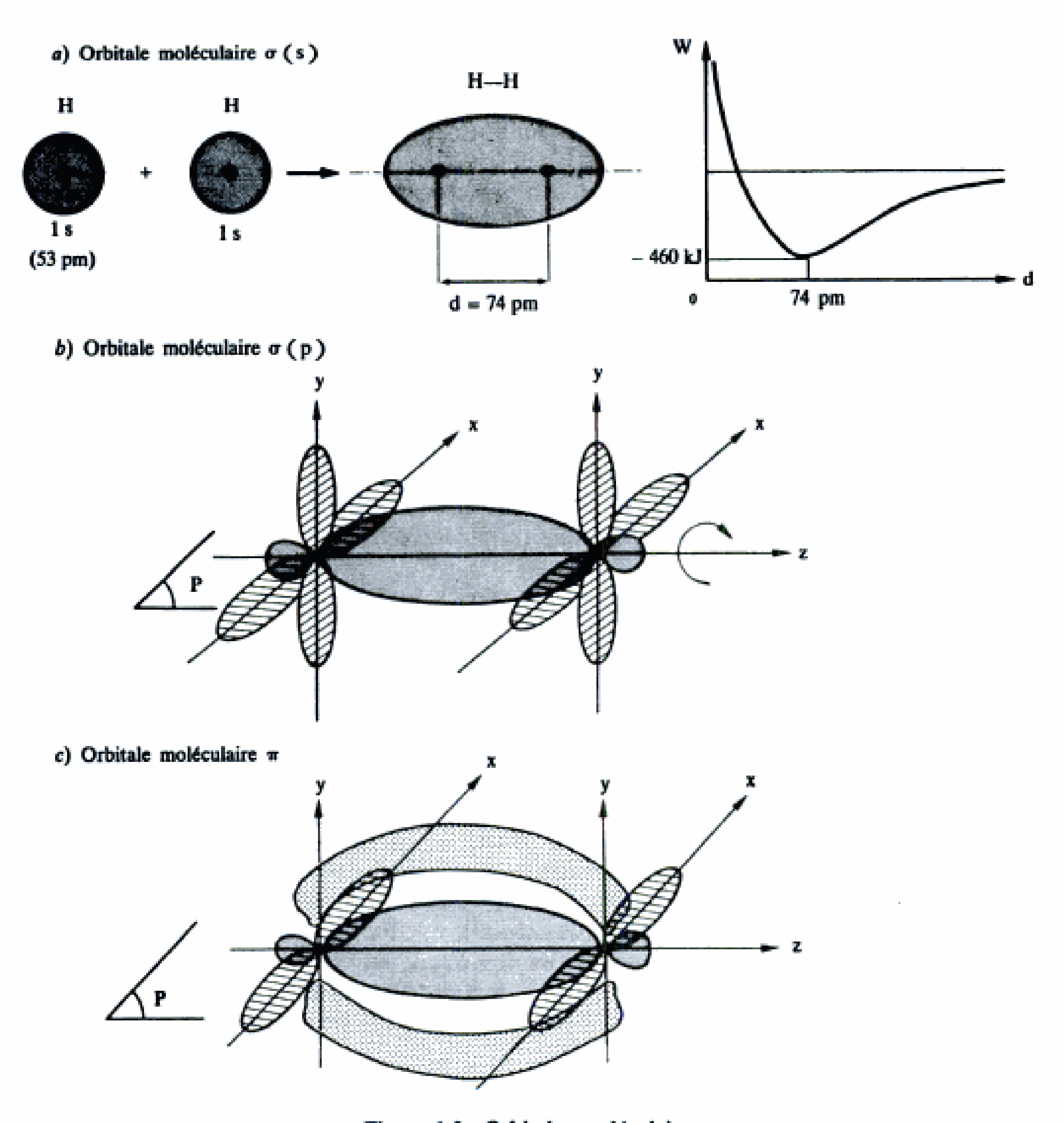


Figure 1.2 Orbitales moléculaires.

On appelle *longueur de la liaison* la distance des noyaux des atomes dans la molécule, elle est ici de 74 pm. Elle représente la somme des *rayons de covalence* de chaque atome.

On appelle *énergie de la liaison* la quantité d'énergie qu'il faut fournir pour rompre la liaison et éloigner les deux atomes ; soit dans le cas de la molécule H_2, 460 kJ/mol. En fait l'énergie propre de la liaison n'est que de 430 kJ/mol, le complément correspond à l'énergie résultant des vibrations des noyaux de la molécule autour de leur position d'équilibre.

Pour cette distance il y a recouvrement des orbitales atomiques 1 s de chaque atome (fig. 1.2) et formation d'une *orbitale moléculaire* dans laquelle la densité électronique est particulièrement importante entre les noyaux sur la ligne qui les joint.

Le nuage électronique résultant est de révolution autour de la droite des noyaux, offrant une possibilité de libre rotation. La *liaison axiale est appelée liaison σ* et les électrons du doublet sont qualifiés d'*électrons σ*.

Cette mise en commun entre les deux atomes conduit chaque électron à occuper la place vacante dans la case 1 s de l'autre atome. La structure obtenue est celle de l'hélium pour lequel la couche K est saturée.

L'orbitale moléculaire σ ainsi formée aboutit à une structure moléculaire H_2 plus stable que n'est la structure atomique 2 H. Cette orbitale est dite *liante*. Par suite du principe de conservation de l'énergie totale du système, il faut admettre l'existence d'une autre orbitale moléculaire d'énergie supérieure, également de symétrie axiale, appelée *orbitale antiliante* et notée σ^*.

Elle ne peut s'observer que lorsque la molécule est excitée, par exemple, par des rayons ultraviolets.

Une liaison σ ayant le même caractère axial peut également résulter du recouvrement de deux orbitales atomiques p (fig. 1.2).

La formation d'une double liaison, comme dans la molécule d'oxygène O═O, par exemple, nécessite le couplage de deux électrons 2 p célibataires situés dans deux orbitales atomiques parallèles. Le recouvrement est cette fois latéral, l'orbitale moléculaire liante est constituée par deux volumes situés de part et d'autre du plan P, interdisant la libre rotation (fig. 1.2). Cette *liaison latérale est dite liaison π* et les électrons du doublet appelés *électrons π*.

De même que pour la liaison σ (s ou p), il existe pour la liaison π la correspondance avec une orbitale moléculaire antiliante π^*.

Cette liaison π présente des caractéristiques en particulier énergétiques différentes de celles de la liaison σ. Elle est moins stable, son énergie est plus faible (tableau II : comparaison des énergies des liaisons C—C et C═C).

La liaison σ est le type de la liaison simple et l'on considérera qu'une double liaison correspond à l'association d'une liaison π et d'une liaison σ.

c. Liaison hétéroatomique ou hétéronucléaire

Dans ce cas, les deux atomes qui participent à la formation du doublet de liaison sont différents.

— En premier lieu, il faut distinguer la *liaison covalente vraie,* dans laquelle le doublet de liaison est formé par un électron célibataire du premier atome associé à un électron célibataire du second, de la *liaison de coordination* ou donneur-accepteur dans laquelle le doublet électronique est fourni par un atome, le donneur, à l'autre ou

accepteur ; ce qui impose certaines conditions, doublet libre pour l'un, orbitale vacante pour l'autre. Ce type de liaison est de même nature et possède les mêmes propriétés que la liaison covalente.

En supposant le doublet cédé partagé, il y a localisation d'une charge positive sur le donneur et d'une charge négative sur l'accepteur.

Exemples :

covalence

$$O: + 2 \times H \rightarrow O \begin{matrix} .\times H \\ .\times H \end{matrix} \text{ ou } O \begin{matrix} \diagup H \\ \diagdown H \end{matrix}$$

$$N^{\cdot}: + 3 \times H \rightarrow N \begin{matrix} .\times H \\ .\times H \\ .\times H \end{matrix} \text{ ou } N \begin{matrix} \diagup H \\ - H \\ \diagdown H \end{matrix}$$

donneur-accepteur

$$\begin{matrix} H \diagdown \\ H - N\!: \\ H \diagup \end{matrix} + H^+ \rightarrow \begin{matrix} H \diagdown \\ H - N - H^+ \\ H \diagup \end{matrix} \text{ ou } NH_4^+$$

Les mécanismes de formation sont donc différents mais au sein des molécules la distinction n'est plus possible.

— En second lieu la nature différente des atomes participant à la liaison influence la répartition électronique.

Dans une liaison homonucléaire comme H—H, le nuage électronique est distribué symétriquement et le doublet σ a une probabilité de présence maximale sensiblement au centre de cette liaison.

Par contre, dans les liaisons O—H, N—H ou encore dans la molécule HCl, la symétrie n'existe plus. Les deux éléments ont des atomes de tailles différentes et n'ont pas la même affinité pour les électrons, leurs électronégativités diffèrent. Le doublet σ subit alors un léger déplacement pour se rapprocher de l'atome le plus électronégatif, ce qui va engendrer une dissymétrie dans la distribution des charges. L'élément le plus électronégatif porte une charge partielle négative, l'autre une charge partielle positive. La *liaison est dite polaire* et elle est caractérisée par un *moment dipolaire permanent,* produit de la charge nette des atomes par la distance qui les sépare. Ce moment sera d'autant plus important que la différence d'électronégativité des atomes sera plus grande.

Exemples d'électronégativités selon **Pauling** (le principe de calcul et les unités ne seront pas envisagés ici) :

H 2,1				
	C 2,5	N 3	O 3,5	
Na 0,9		P 2,1	S 2,5	Cl 3
K 0,8				

Dans une molécule, comme dans une liaison, par suite des déplacements continuels des électrons la répartition des charges n'est pas invariable au cours du temps. Il en résulte au contraire des dissymétries de charges au cours du temps, et par suite un *caractère dipolaire instantané.* Il existe donc dans tous les cas un moment

dipolaire instantané qui oscille avec une fréquence propre caractéristique. Seule la valeur moyenne du moment dipolaire est nulle.

Une molécule ou une liaison, dépourvue de moment dipolaire permanent et placée dans un champ électrique créé par exemple par un ion ou un dipôle permanent, acquiert un *moment dipolaire induit* lié au déplacement des charges sous l'influence du champ électrique. La valeur de ce moment dipolaire induit dépend à la fois du champ électrique et de la nature de la liaison que l'on caractérise par un *coefficient de polarisabilité.*

Cette polarité, importante en biochimie pour les liaisons N—H, O—H, C═O (tableau II) établit une transition entre la liaison covalente pure et la liaison électrovalente. D'où les schémas :

H—⁝—H	$\overset{\delta^-}{—O}$⁝$\overset{\delta^+}{—H}$	—O⁝ H^+
Liaison covalente	Liaison covalente polaire	Liaison électrovalente

Ainsi de nombreuses liaisons covalentes présentent un caractère polaire (on dit encore un pourcentage d'électrovalence ou de forme ionique) qui selon les conditions de milieu et l'influence des autres atomes de la molécule pourra devenir ionique (Ex. : HCl gazeux et $H^+ Cl^-$ en solution aqueuse) et qui, de toute façon, augmentera la mobilité de l'atome. Inversement toute liaison ionique tend par neutralisation partielle des charges vers un certain pourcentage de covalence.

d. Hybridation des orbitales

L'atome de carbone, dans son état fondamental, présente deux électrons célibataires situés dans deux des trois orbitales 2 p. Il devrait donc se comporter comme divalent et donner lieu à la formation de composés tels que CH_2 ou C═C.

Ces composés dont la couche périphérique porterait six électrons ne sont pas stables. De plus, la tétravalence du carbone est un fondement de la chimie organique, et le plus simple des carbures d'hydrogène, le méthane CH_4, renferme quatre liaisons C—H totalement équivalentes.

Il faut donc concevoir que l'atome de carbone offre pour la formation de la molécule quatre orbitales atomiques identiques renfermant chacune un électron célibataire. Ces orbitales sont dirigées selon les quatre axes d'un tétraèdre régulier dont le carbone occupe le centre. De là résulte l'image du *carbone tétraédrique* qui est une construction sans existence réelle.

On interprète ce résultat en admettant que les quatre orbitales ne sont pas des orbitales atomiques pures, mais qu'elles résultent d'un réarrangement ou hybridation de l'orbitale 2 s et des trois orbitales 2 p pour former quatre orbitales équivalentes notées sp 3 contenant chacune un électron célibataire et formant entre elles des angles de 109° 28′ (fig. 1.3).

Cette même structure hybride sp 3 se retrouve dans la liaison simple C—C de la molécule d'éthane par exemple. Les liaisons C—C et C—H sont dans tous les cas des liaisons axiales du type σ. Elles offrent une possibilité de libre rotation d'un atome de carbone par rapport à l'autre, d'où une infinité de *conformations* correspondant à des énergies moléculaires légèrement différentes.

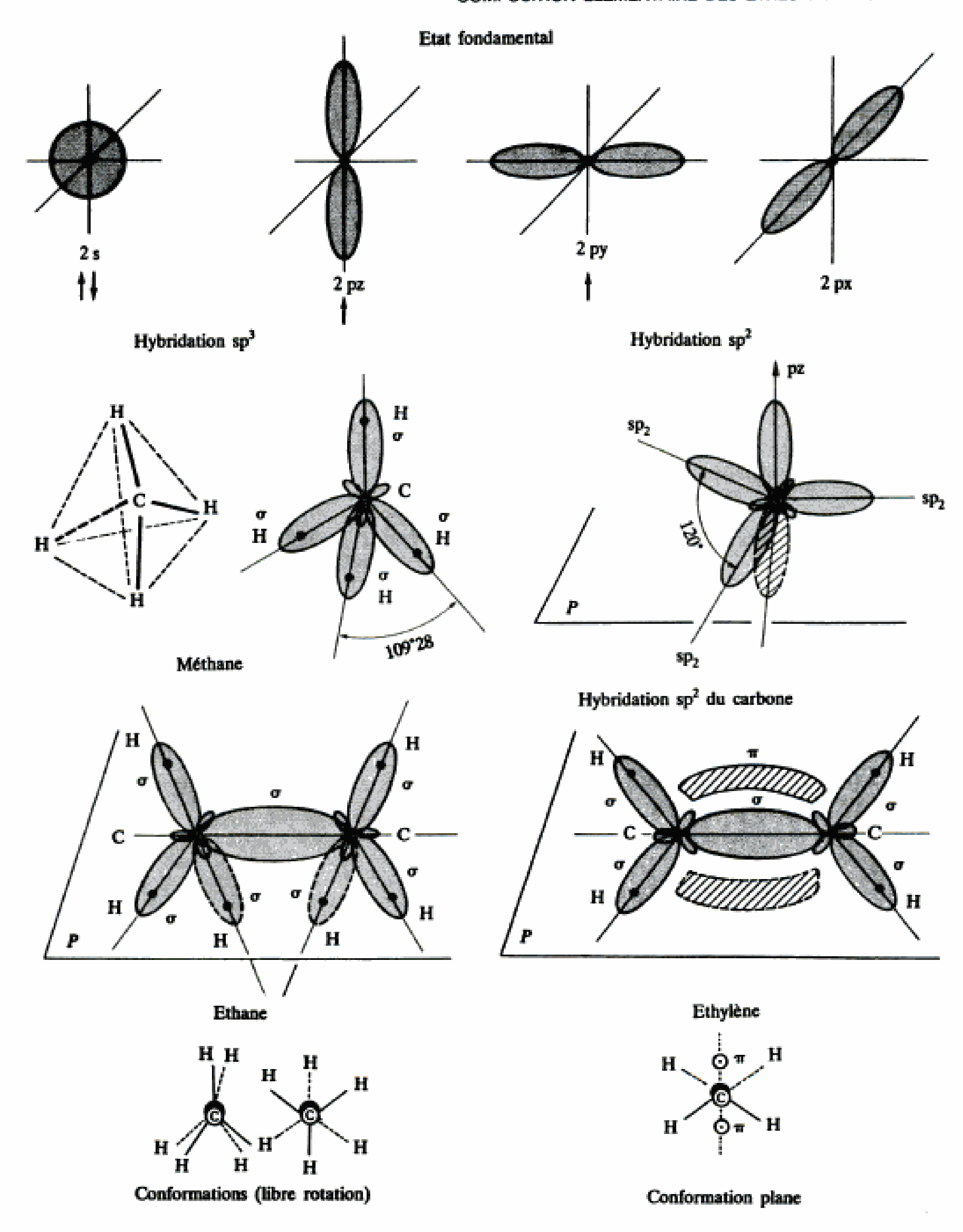


Figure 1.3 Hybridation des orbitales de l'atome de carbone (échelles non respectées).

La molécule d'éthylène C_2H_4 qui forme aisément des dérivés d'addition, comporte une double liaison C═C (σ + π) et une géométrie différente de celle de l'éthane.

La liaison latérale π résulte du recouvrement de deux orbitales atomiques 2 p pures (2 pz par exemple). Les liaisons axiales σ (σ de la double liaison et σ des liaisons C—H) sont équivalentes. Dans ce cas, il faut admettre un autre type d'hybridation, notée sp 2 entre une orbitale 2 s pure et seulement 2 orbitales 2 p pures pour former 3 orbitales hybrides sp 2 équivalentes renfermant chacune un électron.

Ces orbitales sp 2 sont contenues dans un plan perpendiculaire à l'orbitale 2 p pure et forment entre elles des angles de 120° (fig. 1.3). Cette structure impose la planéité de la molécule et supprime les possibilités de libre rotation.

Un autre type d'hybridation dite sp se rencontre lors de la formation d'une triple liaison. Elle ne présente guère d'intérêt en biochimie, la triple liaison étant exceptionnelle.

Enfin il faut noter que les caractéristiques des liaisons C—C (longueurs, énergies) dépendent du type d'hybridation en cause.

Liaisons	>C—C< (σ)	>C═C< (σ + π)
Longueur	154,1 pm	133,7 pm
Energie	368 kJ/mol	614 kJ/mol

Le phénomène d'hybridation des orbitales n'est pas limité au seul élément carbone. Il est en fait beaucoup plus général et permet d'interpréter, avec la polarisation des liaisons, la structure spatiale de nombreuses molécules, H_2O et NH_3 par exemple, pour lesquelles les angles des liaisons sont différents de 90° qui correspondent théoriquement aux angles des orbitales p entre elles.

4. LA LIAISON IONIQUE

La liaison ionique est une interaction de type électrostatique qui s'établit entre deux ions de signes contraires. Deux atomes ou deux groupements d'atomes ayant l'un perdu des électrons (cation chargé positivement), l'autre au contraire accepté des électrons (anion chargé négativement) dans leurs couches périphériques vont s'attirer par une force électrostatique F exprimée par la **loi de Coulomb** :

$|F| = \left| \frac{k}{\varepsilon} \frac{qq'}{d^2} \right|$ dans laquelle ε est la constante diélectrique du milieu, q et q' les charges des ions et d^2 le carré de la distance interionique.

Il en résulte une énergie de la forme :

$$|E| = \frac{k}{\varepsilon} \frac{|qq'|}{d}.$$

De par sa nature, cette force de liaison présente certaines caractéristiques :

— *elle n'est pas dirigée,* mais intéresse tout l'espace sans orientation préférentielle. Il n'y a pas d'interpénétration des couches électroniques ;

— *elle n'est pas spécifique* car elle ne dépend pas de la nature de l'ion mais de sa charge et de sa taille ;

— *elle ne donne pas lieu à un phénomène de saturation* par la présence d'un ion de charge opposée et permet la constitution de réseaux tridimensionnels comme les cristaux ioniques ;

— *elle n'est pas fixe,* car sa valeur, autrement dit la distance interionique, dépend du milieu (ε vide = 1, ε eau = 80), d'où les propriétés ionisantes de certains solvants, l'eau en particulier. C'est une liaison faible, de l'ordre de 20 kJ/mol en solution aqueuse.

Enfin, le nombre d'électrons perdus ou gagnés par l'élément qui tend ainsi par transfert d'électrons vers une configuration de gaz rare constitue son *électrovalence.*

III. LES OLIGOÉLÉMENTS

A. Méthodes de détermination

— Elles peuvent être ramenées à deux types fondamentaux selon qu'elles procèdent par analyse ou par synthèse.

1. LA MÉTHODE ANALYTIQUE

Elle consiste à faire l'analyse chimique d'un organisme ou de ses cendres. Elle permet de caractériser et de doser un oligoélément, ce qui nécessite l'utilisation de techniques sensibles et précises d'où le parallélisme entre l'évolution de ces techniques et l'allongement de la liste des oligoéléments. Les résultats de cette méthode physicochimique permettent d'affirmer, pour une espèce donnée, la présence constante d'un élément à l'état de traces, les variations possibles selon l'âge, les organes, etc., mais non le caractère indispensable.

2. LA MÉTHODE SYNTHÉTIQUE

Plus biologique, elle consiste à préparer des milieux de culture pour les végétaux et les micro-organismes ou des rations pour les animaux à partir de composés rigoureusement purs (elle est donc tributaire par ce point de la méthode analytique). Certains de ces régimes sont dépourvus de l'élément, les autres additionnés de quantités variables sous une forme assimilable. L'observation des réactions des organismes en expérience permet de déterminer : *le caractère indispensable* de l'oligoélément, *la concentration la plus favorable* assurant un développement complet et maximum, quelquefois le rôle d'après *les troubles et les anomalies en cas de carence.*

B. Résultats

La répartition des oligoéléments. — De nombreux oligoéléments ont été caractérisés dans la plupart des espèces animales et végétales.

Ex. Les éléments Fe, Zn, Mn, Cu, Mo, B, Co, Ni, Al, F, Bi, I, etc.

Si le plus souvent ces oligoéléments sont communs à l'ensemble des êtres vivants, il est des cas où certains d'entre eux ne semblent jouer aucun rôle. La notion d'oligoélément doit donc être rapportée à une espèce donnée.

La dose optimale. — L'effet produit par un oligoélément dépend de sa concentration dans l'organisme, donc de sa forme et de sa concentration dans le milieu. Schématiquement deux cas peuvent être envisagés.

— Le plus souvent l'effet d'abord favorable pour l'organisme croît avec la concentration ; mais après un maximum, il devient défavorable par suite d'un *phénomène de toxicité* qui peut se manifester plus ou moins rapidement (courbes 1 et 2 de la fig. 1.4).

— Assez rarement, l'élément n'est pratiquement *pas toxique* et l'effet reste sensiblement maximum quand la concentration s'élève (courbe 3).

Dans ces expériences, la valeur de l'*optimum* et la toxicité dépendent de l'espèce considérée et de l'effet recherché. La détermination suppose également que tous les autres facteurs sont favorables.

Le rôle. — Les oligoéléments sont des éléments à *rôle catalytique*. Ils interviennent le plus souvent, soit sous forme d'ions, soit sous forme de complexes, dans les réactions biochimiques en participant à des phénomènes de catalyse, de transport ou de régulation. Il faut toutefois remarquer que certains d'entre eux possèdent un rôle plastique non négligeable (Ex. F pour les animaux, Si pour les végétaux) et que des éléments majeurs peuvent également participer à des phénomènes catalytiques.

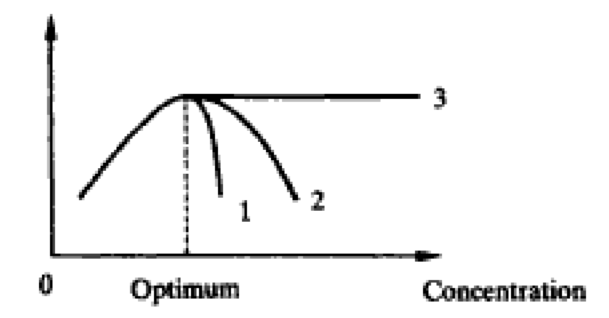


Figure 1.4 Influence de la concentration d'un oligoélément sur l'intensité de l'effet favorable (d'après D. Bertrand).
1. Action du bore sur la Betterave ; 2. action du zinc sur la Souris ; 3. action de l'iode chez l'Homme.

2
Les constituants minéraux

L'eau

L'observation et l'analyse chimique révèlent la présence universelle de l'eau dans la matière vivante. Un apport insuffisant d'eau ou la déshydratation d'un organisme entraîne des perturbations graves qui peuvent finalement provoquer sa mort.

L'eau représente, à de rares exceptions près, la substance la plus généralement répandue, la plus indispensable et aussi la plus abondante de la matière vivante.

I. RÉPARTITION DE L'EAU DANS LES ORGANISMES

Analytiquement il est possible d'évaluer soit l'hydratation de chaque organe, soit, ce qui présente plus d'intérêt, la répartition de l'eau selon les compartiments de l'organisme.

A. Teneur globale

La teneur globale en eau des organismes est variable mais toujours élevée :

— les végétaux en sont généralement riches (75 % et plus chez les végétaux verts) ;

— les invertébrés ; pour la plupart d'entre eux, la teneur en eau atteint 80 %, certaines Méduses renferment même jusqu'à 95,4 % d'eau (l'eau de mer en contient 96,5 %) ;

— les vertébrés, par suite de l'existence d'un squelette interne, sont un peu plus pauvres (60 à 70 % chez l'homme adulte mais par contre 97,5 % chez l'embryon de six semaines).

Dans quelques cas, cette teneur peut devenir extrêmement faible, inférieure à 10 %. Ex. : graines et spores pour les végétaux et les micro-organismes. Rotifères et

Tardigrades chez les animaux. Elle correspond à un état de vie ralentie, peu actif, mais par contre résistant. Cependant, pour la plupart des organismes, les variations ne peuvent se faire que dans d'étroites limites, le plus souvent inférieures à 10 % de la masse d'eau totale.

B. Répartition

La teneur en eau d'un organisme varie dans de larges proportions, selon les organes ou les tissus considérés. De plus, l'eau ne constitue pas un milieu continu comme elle le ferait dans un récipient car au sein d'un être vivant diverses barrières viennent compartimenter la masse aqueuse. On dit encore que l'*espace hydrique est subdivisé en secteurs hydriques*.

1. RÉPARTITION SELON LES TISSUS

Quelques exemples relatifs à l'organisme humain suffisent à mettre en évidence les grandes variations.

Ex. :	Email dentaire	0,2 %
	Tissu osseux	20-30 %
	Tissu musculaire	75 %
	Sang	80 %

Ces valeurs n'ont qu'un intérêt limité car il faut également tenir compte de l'importance du tissu. C'est ainsi que la moitié de l'eau du corps humain est localisée dans le tissu musculaire pondéralement très développé, alors que l'eau du tissu sanguin ne correspond qu'à 10 % environ de l'eau totale.

2. RÉPARTITION SELON LES SECTEURS HYDRIQUES

Il existe dans les organismes des animaux supérieurs, les seuls qui seront envisagés ici, deux barrières qui compartimentent l'espace hydrique (fig. 2.1).

— la *membrane cellulaire* qui délimite un *secteur intracellulaire* et un *secteur extracellulaire ;*

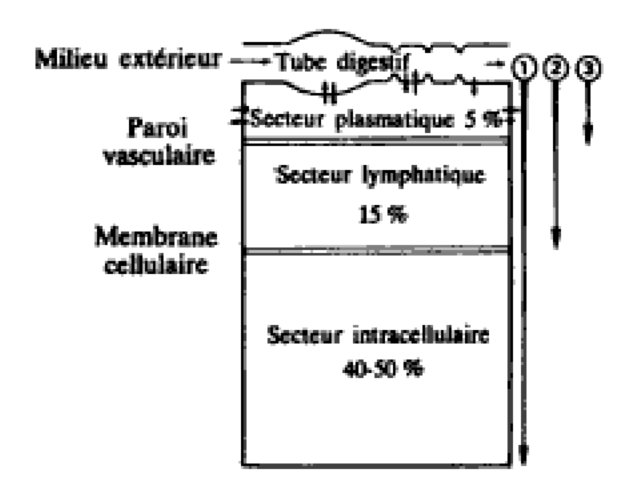


Figure 2.1 Secteurs hydriques de l'organisme humain (d'après Gamble).

— la *paroi vasculaire* qui subdivise ce dernier en un *secteur intravasculaire ou plasmatique* et un *secteur interstitiel ou lymphatique*.

Les volumes de ces compartiments hydriques peuvent être déterminés en utilisant des substances plus ou moins diffusibles.

Si une quantité Q connue de substance est injectée dans le plasma et qu'après un temps suffisant de diffusion sa concentration plasmatique soit devenue C, en appelant V, le volume dans lequel a diffusé la substance, on a la relation $Q = C \times V$. Ce qui permet de calculer V. La nature du volume déterminé ou *espace de diffusion* dépend des possibilités de diffusion de la substance.

— Si la substance diffuse dans tout l'organisme, au travers des membranes (Ex. : antipyrine, eau lourde, eau tritiée) et si de plus elle n'est pas normalement présente, ni métabolisée, ni éliminée trop rapidement, V correspond à l'espace de diffusion totale, noté (1) sur la figure.

— Si, au contraire, la substance franchit l'endothélium des capillaires mais ne pénètre pas dans les cellules (Ex. : SCN^-, inuline, mannitol, isotopes du sodium, du chlore), si de plus elle ne se fixe pas sur les protéines plasmatiques et n'est pas trop rapidement éliminée, V correspond à l'espace de diffusion extracellulaire (2).

— Enfin, il est possible de déterminer le volume plasmatique (3) à l'aide de substances ne franchissant pas l'endothélium vasculaire.

Les volumes des espaces intracellulaire et interstitiel sont calculés par différence, respectivement (1 – 2) et (2 – 3). Dans les mesures, des corrections doivent être apportées pour tenir compte du fait que les substances utilisées ne répondent pas idéalement aux conditions énoncées ci-dessus. Les résultats diffèrent légèrement selon les substances et les moyennes sont : pour le secteur intracellulaire 40 à 50 % du poids corporel, pour le secteur extracellulaire 20 % dont 5 % correspondant au secteur plasmatique et 15 % au secteur interstitiel.

II. STRUCTURE ET PROPRIÉTÉS DE L'EAU

A. La molécule d'eau

1. POLARITÉ

Par suite de l'hybridation des orbitales atomiques de l'oxygène dans un état voisin de sp^3, la molécule H_2O, constituée par deux liaisons polaires —O—H n'est pas linéaire, mais possède une forme angulaire. Il en résulte une dissymétrie dans la répartition des charges positives et négatives. Elle se comporte comme un ensemble de deux charges ponctuelles : c'est une molécule polaire ou dipôle permanent caractérisé par un moment dipolaire (fig. 2.2).

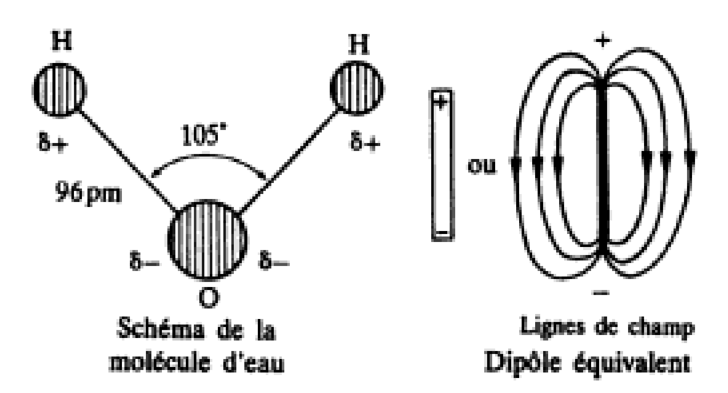


Figure 2.2 Structure de la molécule d'eau.

Cette structure polaire permet d'interpréter diverses propriétés.

2. DISSOCIATION, ASSOCIATION, LIAISON HYDROGÈNE

a. Dissociation

Un certain nombre de liaisons polaires peuvent devenir ioniques.

$$—O—H \rightarrow —O^- + H^+$$

La molécule d'eau est alors ionisée selon l'équilibre $H_2O \rightleftarrows H^+ + OH^-$. Pour l'eau pure à 25 °C la dissociation est telle que $(H^+)(OH^-) = 10^{-14}$ avec bien sûr $(H^+) = (OH^-)$.

Cela signifie que le nombre de molécules d'eau ionisées est défini et statistiquement constant pour une température elle-même constante.

b. Association, liaison hydrogène

Chaque molécule d'eau crée, par sa structure dipolaire permanente, un champ électrique. Les charges partielles étant faibles, le champ est peu intense et n'a d'effet que dans un faible volume situé au voisinage immédiat de la molécule (fig. 2.2).

Lorsque deux molécules d'eau se trouvent très proches l'une de l'autre (à 4 °C la séparation moyenne des molécules d'eau est de 300 pm, elles vont exercer des actions électrostatiques réciproques au niveau d'un atome d'hydrogène pour l'une et d'un atome d'oxygène pour l'autre.

```
H\            —H\
   O <  - - -      O
H/            —H/
   —  −       + —  −
```

Cette *interaction mutuelle* a pour conséquence l'établissement d'un « lien » entre les deux molécules par l'intermédiaire d'un atome d'hydrogène, d'où les termes de *liaison hydrogène ou pont hydrogène.* Elle est schématisée par des tirets ou des points.

Ce mode d'association présente un intérêt tout particulier en biochimie notamment dans les problèmes de structure des macromolécules en particulier des protéines.

La liaison hydrogène n'est pas une liaison chimique au même titre que la covalence, son origine et ses caractéristiques sont différentes.

— La liaison hydrogène est un cas particulier des *liaisons dites de* **Van der Waals** qui résultent d'interactions entre toutes les molécules neutres par suite de l'existence d'un caractère polaire permanent ou induit ou même simplement d'un caractère polaire instantané (p. 13).

— La liaison hydrogène possède des caractéristiques particulières.

• **Trois atomes participent à la liaison hydrogène :** un atome d'hydrogène et deux atomes plus électronégatifs, l'un d'entre eux créant la liaison polaire avec l'atome d'hydrogène.

Exemples en biochimie :

$$\overset{\delta-}{-O}-\overset{\delta+}{H}\cdots O= \;,\quad =\overset{\delta-}{N}-\overset{\delta+}{H}\cdots N\;,\quad =\overset{\delta-}{N}-\overset{\delta+}{H}\cdots O=$$

La liaison est pratiquement *linéaire*, les trois atomes sont sensiblement alignés.

• **Sa longueur** (en fait, on indique généralement la distance séparant les deux atomes électronégatifs), qui varie selon les atomes ainsi réunis, est de l'ordre de 250 à 300 pm.

• C'est une **liaison faible.** Son énergie est d'environ 8 à 34 kJ/mol soit dix à vingt fois plus faible que celle d'une liaison covalente.

Une liaison hydrogène peut donc dans certaines conditions (en solution par exemple) se rompre et se reformer très facilement même à la température ordinaire. Par suite, sa position n'est pas permanente comme pour la covalence mais au contraire elle est aléatoire et sa durée d'existence peut être brève. C'est une **liaison au sens statistique.**

• La liaison hydrogène peut être **intramoléculaire** si la nature des atomes et les conditions géométriques le permettent. Elle est, le plus souvent, **intermoléculaire.**

Exemples de liaisons hydrogène intermoléculaires :

```
      O—H·······O
     /           \\
R—C               C—R ,
    \\           /
      O·······H—O

O—H·······O—H·······O—H ,
|         |         |
R         R         R

      O·······H2N
    //          \
R—C              C—R
    \          //
      NH2·······O
```

Les composés qui présentent la possibilité de constituer des édifices polymoléculaires par l'intermédiaire de liaisons hydrogène ont des propriétés physiques particulières, notamment : températures de fusion et d'ébullition élevées, pour les liquides constantes diélectriques importantes, spectres infrarouges et spectres Raman avec des bandes caractéristiques ce qui permet d'ailleurs l'étude de ce mode de liaison, etc.

L'eau est donc un *composé fortement polaire* caractérisé par des *forces d'attractions intermoléculaires* élevées.

A l'état de vapeur, la distance moyenne entre les molécules d'eau et l'agitation moléculaire sont trop importantes pour que les liaisons hydrogène intermoléculaires aient une existence réelle. Les molécules sont pratiquement indépendantes les unes des autres.

A l'état solide (glace), au contraire, l'eau possède une structure cristalline dans laquelle les molécules sont localisées au sommet d'un réseau tétraédrique (fig. 2.3) avec un nombre élevé de liaisons intermoléculaires.

A l'état liquide, l'eau présente une structure intermédiaire plus irrégulière que dans la glace mais aussi plus compacte. Il ne subsiste qu'un nombre moins important de liaisons hydrogène. Cette eau condensée par des liaisons intermoléculaires n'est pas un état statique car les liaisons se rompent et se reforment en fonction de l'agitation thermique.

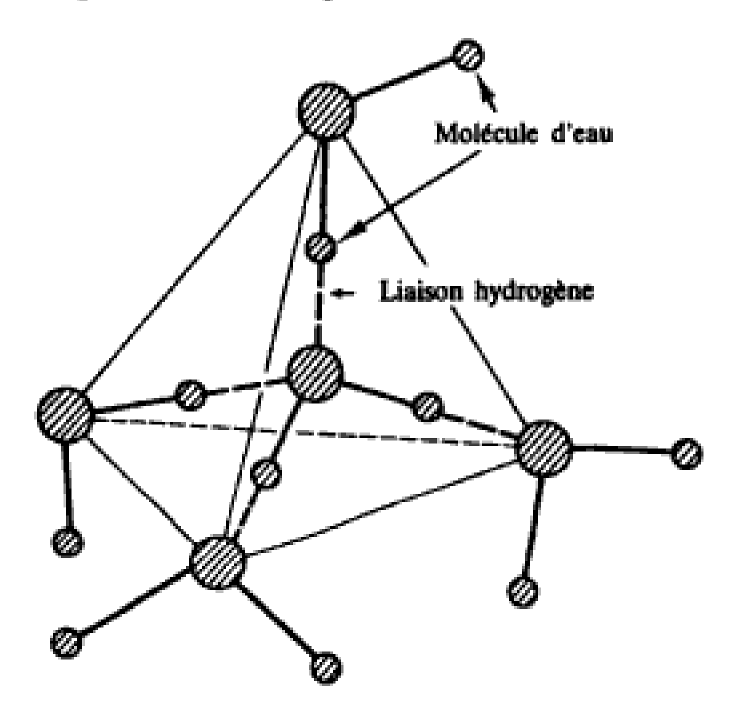


Figure 2.3 Structure de la glace.

B. Comportement des composés en présence d'eau

1. LES COMPOSÉS HYDROSOLUBLES

Ces composés forment avec l'eau, après agitation, un mélange stable et homogène même à l'observation microscopique : c'est une solution aqueuse. Le composé est dit *hydrosoluble* s'il était initialement solide, *miscible* à l'eau s'il était liquide.

Une solution peut donc être définie comme un état homogène liquide constitué par une phase dispersante appelée *solvant* et une phase dispersée composée d'un ou de plusieurs *solutés*.

Pour parvenir à un tel état certaines conditions sont indispensables.

— D'une part les attractions entre les molécules du composé doivent être plus faibles que celles exercées par les molécules d'eau de manière à permettre la

dispersion du soluté. La diffusion doit l'emporter sur la cohésion. Or les attractions entre les molécules d'eau et celles de soluté sont dues à l'établissement de liaisons faibles ou secondaires, en particulier de type électrostatique par suite de la structure polaire de l'eau.

Ex. : Liaison hydrogène entre une molécule d'eau et un groupement polaire du composé, liaison ion-dipôle entre un anion ou un cation et un dipôle aqueux.

Ces liaisons permettent aux molécules de soluté de se disperser dans le réseau des molécules d'eau. Elles pourront s'établir avec des composés ionisés, des molécules polaires ou des macromolécules riches en groupements polaires superficiels.

Ex. : Chlorure de sodium, éthanol, acide éthanoïque, protéines en général.

— D'autre part, pour que la solution obtenue soit stable, il est nécessaire que la diffusion, conséquence de l'agitation moléculaire, l'emporte sur la sédimentation résultant de l'action des forces de pesanteur (ou éventuellement sur la flottaison). Dans le cas contraire il y aura décantation.

Pour que ces forces de pesanteur soient réduites, la masse des particules en solution (ion, molécule, macromolécule) ne doit pas être trop élevée. Ce qui limite leur taille, bien que la forme de la particule joue aussi un rôle important.

D'après la nature des particules, on distingue plusieurs types de solutions.

— Les unes *monodispersées* ne sont constituées que de particules ayant sensiblement la même taille ; les autres *polydispersées* renferment des particules de tailles variées séparables grâce aux techniques analytiques.

— *Les solutions moléculaires* (solutions vraies) ont leurs solutés constitués d'ions et de molécules dont la masse molaire est en général inférieure à 10.000.

— *Les solutions macromoléculaires* dont le soluté est formé de macromolécules.

— *Les solutions micellaires* dans lesquelles le soluté est constitué de particules volumineuses ou micelles résultant de l'agrégation de macromolécules.

Ces deux derniers types de solutions qui présentent des propriétés particulières sont encore appelés *solutions colloïdales ou sols.*

Influences réciproques eau-soluté.

Par suite de la forte polarité de la molécule d'eau, traduite par une constante diélectrique élevée ($\varepsilon = 80$), une liaison fortement polaire, partiellement ionique, peut se trouver affaiblie entraînant sa dissociation en deux ions. *L'eau est un solvant ionisant,* c'est même le plus ionisant des solvants usuels. Les ions résultants, chargés électriquement, vont s'entourer d'un certain nombre de dipôles aqueux pour former des *ions solvatés.* Le nombre de dipôles ainsi liés dépend à la fois de la taille et de la charge de l'ion.

Ex. : Le cation Na^+ s'entoure en moyenne de huit molécules d'eau, le proton H^+ se fixe à une molécule d'eau pour former l'ion hydroxonium H_3O^+. La dissociation de l'eau doit donc être écrite :

$$2\,H_2O \leftrightarrows H_3O^+ + OH^- \quad \text{et} \quad pH = -\lg\left(H_3O^+\right).$$

En fait, il ne s'agit pas d'une relation rigoureuse et statique, mais d'un nombre

moyen de molécules formant un nuage autour de l'ion à un instant donné, la durée de présence d'une molécule d'eau étant de l'ordre de 10^{-13} seconde. Ces déplacements incessants en rapport avec l'agitation thermique permettent d'interpréter la mobilité des ions en solution aqueuse (fig. 2.4).

$$R{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}\overset{-\delta}{O}{\cdots}\overset{+\delta}{H} + \text{eau} \xrightarrow{\text{Dissociation}} R{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}O^- + H^+$$

soluté polaire — solvant — Ion H_3O^+ — Solvatation — Mobilité

Figure 2.4 Relations eau-soluté dans le cas d'un composé ionisable.

Inversement, le soluté entraîne par sa présence une modification plus ou moins importante de la structure de l'eau allant depuis des interactions électrostatiques (eau liée) jusqu'à une simple orientation préférentielle des dipôles aqueux (eau orientée). La figure 2.5 ne donne qu'un aspect très schématique du phénomène par suite de l'impossibilité de respecter l'échelle. Ainsi chaque tiret représentant un dipôle aqueux, si la particule est une protéine de forme sphérique et de masse moléculaire 540.000 daltons, son diamètre devrait être 80 fois plus grand que celui de la molécule d'eau et son volume environ 500.000 fois plus important.

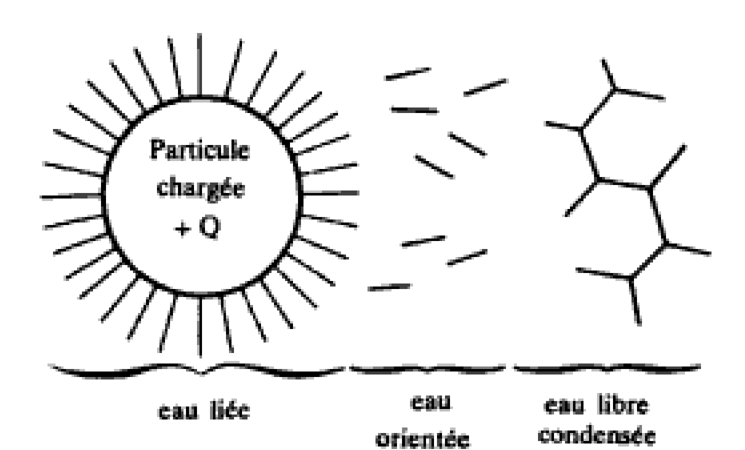


Figure 2.5 Schéma de l'influence du soluté sur l'orientation des dipôles aqueux.

2. LES COMPOSÉS HYDROPHILES

Après agitation à la température ambiante, certains composés ne forment pas une solution, mais un état dispersé hétérogène et instable appelé *suspension*, qui sédimente rapidement.

Cependant, ces composés abandonnés à l'air ambiant fixent de l'eau et parfois en proportion importante. La rétention d'eau est d'ailleurs accompagnée d'un gonflement.

Ex. : Le papier filtre et le coton hydrophile constitués de cellulose pratiquement pure peuvent fixer plus de 30 % de leur poids sec d'eau.

De plus, leur structure chimique met en évidence la présence de nombreux groupements ionisables ou polaires et il suffit en général d'une élévation de température ou d'une légère modification chimique pour les rendre hydrosolubles.

Ex. : Après agitation à la température ordinaire, l'eau et l'amidon forment une suspension appelée lait d'amidon qui tend rapidement à décanter. Par contre, si cette suspension est chauffée vers 70 °C, elle se transforme en une solution colloïdale : l'empois d'amidon. Ces composés présentent donc une affinité marquée pour l'eau, ils sont *hydrophiles* (amis de l'eau) mais non hydrosolubles dans les conditions ordinaires.

Parmi ces composés, de nombreux possèdent une structure macromoléculaire fibreuse, c'est-à-dire orientée dans l'espace selon une direction privilégiée. Ces macromolécules peuvent s'unir les unes aux autres par des liaisons pour constituer un *réseau tridimensionnel* non périodique (fig. 2.6).

La nature des *liaisons ou ponts* assurant la réticulation est variable.

Exemples :

— liaison de covalence comme la liaison disulfure —S—S ;

— liaison ionique entre deux groupements ionisés de signes contraires et appartenant à deux molécules différentes ;

— liaison dipôle entre deux groupements polaires appartenant aussi à des molécules différentes ;

— liaisons hydrogène, dipôle—ion, etc.

Selon la nature, le nombre et la répartition des liaisons, le réseau est plus ou moins fortement réticulé. Les dimensions des mailles et leur régularité sont également variables (fig. 2.6).

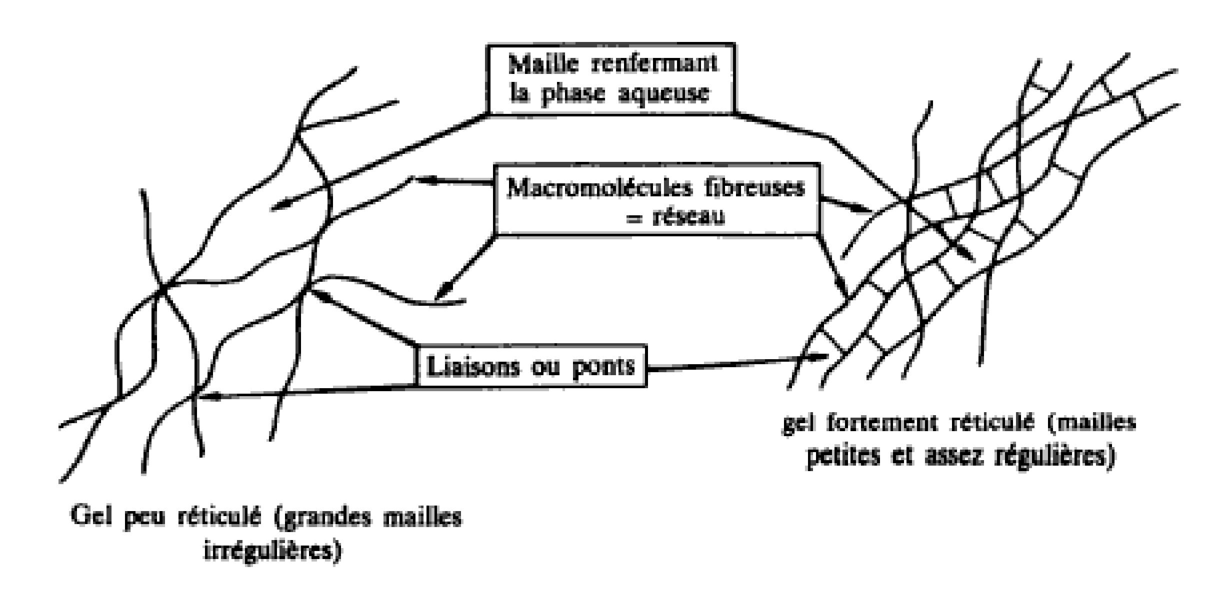


Figure 2.6 Structures schématiques de gels. La structure doit être imaginée dans l'espace par analogie avec une éponge.

En présence d'eau, à condition que le composé soit en concentration suffisante, il est possible d'obtenir un système formé de deux phases :

— une phase macromoléculaire constituée par un réseau tridimensionnel, continu, non périodique ;

— une phase aqueuse également continue, qui occupe les mailles du réseau macromoléculaire.

Un tel système, doué de propriétés particulières (rigidité, élasticité, gonflement, viscosité) est appelé *un gel*.

Ex. : La gélose (p. 182) n'est pas hydrosoluble à la température ordinaire. Par chauffage on obtient une solution colloïdale qui, au refroidissement, se prend en masse pour former un gel à condition que la concentration en gélose soit suffisante pour permettre la constitution du réseau macromoléculaire continu. Cette préparation est très utilisée en bactériologie.

Les gels ont reçu de nombreuses applications aussi bien en biochimie analytique (chromatographie, filtration, électrophorèse, immuno-électrophorèse) qu'en microbiologie (milieux de culture, réactions immunologiques). Enfin certains d'entre eux sont des constituants naturels de la matière vivante.

Ex. : substance interstitielle du tissu conjonctif, corps vitré de l'œil.

3. LES COMPOSÉS HYDROPHOBES

Certains composés, enfin, comme les corps gras (huiles, graisses) et les substances qui leur sont associées, non seulement ne forment pas de solutions en présence d'eau, mais s'orientent de manière à présenter le minimum de contact avec le solvant aqueux. De telles substances qui présentent une répulsion vis-à-vis de l'eau sont dites *hydrophobes*. Leur structure moléculaire fait apparaître un nombre élevé de liaisons covalentes, apolaires et l'absence presque totale de groupements polaires (p. 237).

III. ÉTATS ET ROLES DE L'EAU DANS LA MATIÈRE VIVANTE

Il ressort de l'étude précédente que l'eau de la matière vivante peut être libre ou liée.

• **L'eau libre,** dont la vaporisation est facile, est solvante. Elle participe aux phénomènes osmotiques et se solidifie à une température de 0 °C. C'est l'eau telle que nous la concevons habituellement. Elle peut être circulante (eau plasmatique), capillaire (eau interstitielle) ou intracellulaire.

• **L'eau liée,** eau de constitution liée aux ions et aux macromolécules hydrophiles. Cette fraction difficilement vaporisée n'est pas quantitativement définie. Elle traduit le fait qu'une partie, variable selon les conditions ambiantes, de l'eau d'un organisme ne possède pas les propriétés habituelles.

• **Les rôles de l'eau** dans un organisme sont nombreux.

Rôle de solvant. Il peut aller de la simple dispersion à la solubilité et à l'ionisation. Il en résulte que l'eau est à la fois un agent de transport et un milieu réactionnel structuré.

Rôle de réactif chimique. L'eau intervient dans l'équilibre acidobasique (c'est un solvant amphotère) et, à l'état moléculaire, elle participe aux réactions d'hydrolyse ainsi qu'à de nombreuses réactions d'oxydoréduction.

Enfin l'eau a un rôle essentiel dans les phénomènes de la *régulation thermique,* par suite de la valeur élevée des constantes (chaleur spécifique, conductibilité thermique, chaleur latente de vaporisation).

Les ions et les sels minéraux

Les sels minéraux constituent les cendres résultant de l'incinération de la matière vivante ; mais, au cours de ce traitement, un certain nombre d'entre eux sont détruits, partiellement décomposés ou volatilisés. Dans un organisme les principaux sels minéraux correspondent aux combinaisons des cations : Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} et des anions Cl^-, HCO_3^-, $H_2PO_4^-$ et HPO_4^{2-}, SO_4^{2-}.

I. NATURE ET RÉPARTITION

• Certains sels sont présents à **l'état solide,** cristallisés, non ionisés mais en équilibre avec leurs ions en solution. Ce sont essentiellement le phosphate et le carbonate de calcium.

Ex. : Les coquilles et les carapaces d'Invertébrés renferment une proportion importante de carbonate de calcium sous diverses formes de cristallisation.

Les os des Vertébrés, tissus fortement minéralisés (70 % du poids sec et dégraissé) sont formés d'un mélange de phosphate et de carbonate calciques sous forme de carbonato-apatite et hydroxy-apatite :

$$\left[Ca, 3\left(PO_4\right)_2Ca_3\right]^{2+}, \quad 2\,OH^- \quad \text{ou} \quad CO_3^{2-}.$$

Les cristaux intravacuolaires de nombreuses cellules végétales sont constitués par des sels de calcium d'acides organiques.

• D'autres sels sont **en solution, à l'état ionisé ou non.** Leur répartition intra et extracellulaire est traduite par l'ionogramme (fig. 2.7).

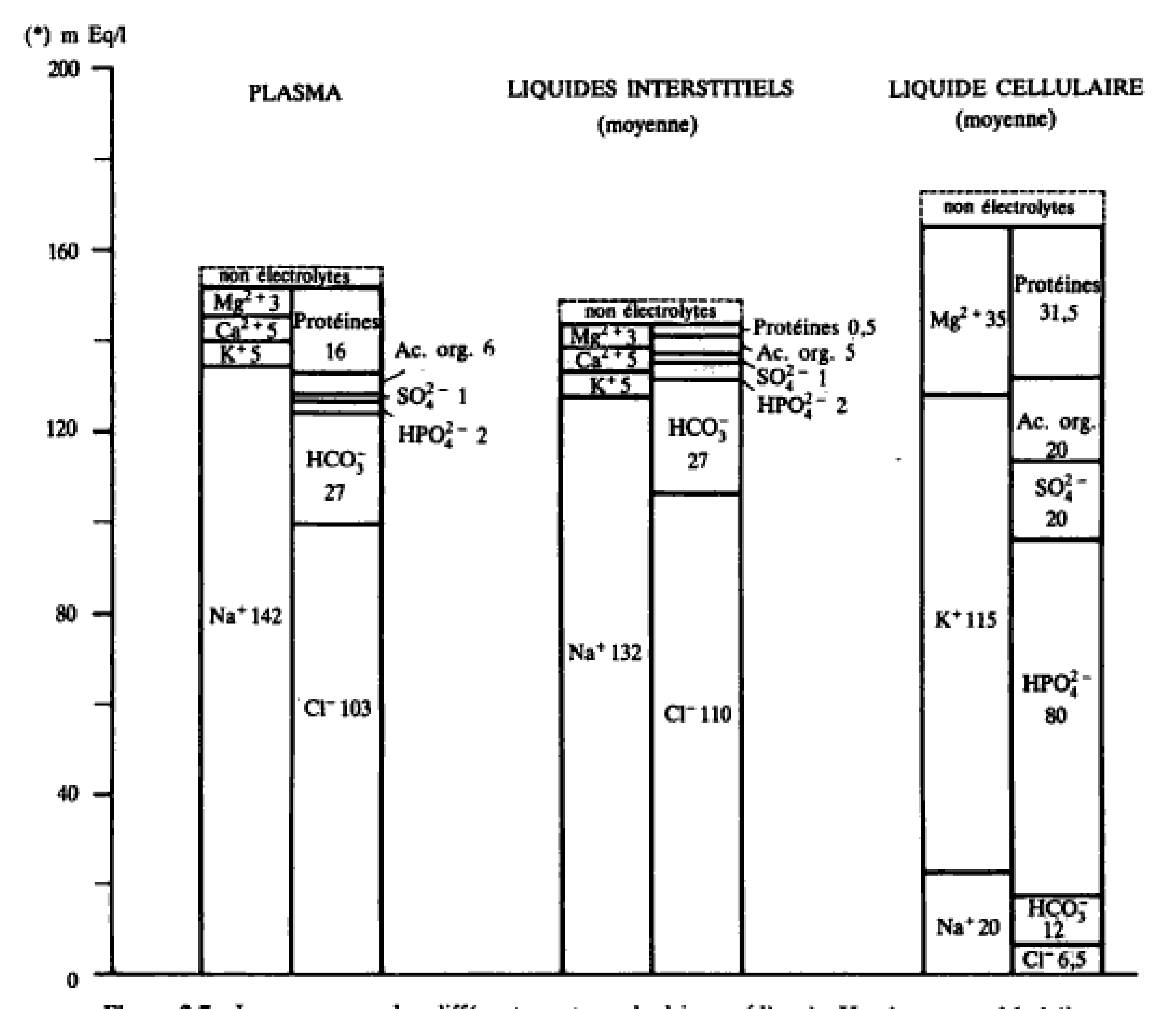


Figure 2.7 Ionogrammes des différents secteurs hydriques (d'après Hamburger et Mathé).

II. LES PRINCIPAUX ÉLÉMENTS MINÉRAUX

A. L'élément chlore

— C'est un constituant normal des tissus et des humeurs. Chez les végétaux la teneur en chlore dépend des espèces, mais aussi des conditions de milieu. Les plantes

(*) Notation définie page 33.

marines renferment plus de chlore que les plantes terrestres dans lesquelles le taux varie selon qu'elles se développent en montagne (sol cristallin), en plaine (sol sédimentaire) ou au bord de la mer. Cette adaptation est beaucoup moins nette chez les animaux où l'on observe toutefois une diminution de la teneur en chlore des Invertébrés marins aux poissons de mer puis aux poissons d'eau douce.

Le chlore est présent essentiellement sous *forme minérale* (ion Cl^-) associé au sodium et au potassium. Il est exceptionnel sous forme de dérivé chloré organique.

Ex. : Antibiotiques sécrétés par des *Streptomyces ;* le chloramphénicol ou chloromycétine contient deux atomes de chlore, la chlorotétracycline ou auréomycine un seul.

L'ion chlore représente le *plus abondant des anions du milieu extracellulaire* où il est associé aux hydrogénocarbonates HCO_3^-. Cet ion est généralement peu abondant dans le milieu intracellulaire à quelques exceptions près : hématies, muqueuse gastrique, muqueuse intestinale et néphrons qui représentent des lieux d'échanges.

L'ion chlore participe, par suite de la perméabilité des membranes, au maintien de la neutralité électrique dans les différents compartiments de l'organisme (***Ex.*** : le phénomène de Hamburger) ainsi qu'au maintien de la pression osmotique, en association avec les ions Na^+ à l'extérieur des cellules.

B. Les éléments sodium et potassium

— Le sodium domine chez les animaux alors que c'est presque toujours le potassium qui est plus abondant chez les végétaux, même pour les plantes marines. L'importance de cet élément explique la nécessité des engrais potassiques et l'ancienne utilisation des cendres végétales pour le lessivage (abondance de carbonate de potassium K_2CO_3). Par contre, le sodium est très souvent l'élément majeur le plus faiblement représenté dans les plantes, à l'exception de quelques halophytes des terrains salés (***Ex.*** : *Salsola soda*).

Présents à l'état de cations, ces deux éléments ont des répartitions différentes :

Na^+ *est le principal cation du milieu extracellulaire,* dans lequel il contribue d'une manière prépondérante au maintien de l'hydratation et de la pression osmotique. Ses mouvements sont étroitement liés aux échanges d'eau et, de plus, il peut dans une certaine mesure remplacer le potassium dans les cellules.

K^+ *est un cation typiquement intracellulaire,* surtout dans les tissus à forte activité physiologique (muscle strié, cœur, etc.). Le milieu extracellulaire n'en contient qu'une faible quantité mais son importance est grande car le rapport (Ki)/(Ke) influence le potentiel membranaire et l'activité cellulaire. Une partie du potassium intracellulaire se trouve lié aux protéines et intervient ainsi dans divers phénomènes métaboliques.

C. Les éléments calcium et magnésium

— Tous deux sont universellement répandus, le premier en quantité parfois importante, le second toujours en faible quantité.

Le ***magnésium*** représente 1 % du poids sec des feuilles par suite de sa présence dans la chlorophylle ; on le trouve également lié au calcium et au phosphore (inositolhexophosphate) dans les graines. Par contre dans les racines et dans les tiges le calcium domine nettement. Chez les animaux, cet élément est avant tout un *constituant des tissus* (rein, muscle, tissu nerveux et surtout tissu osseux), il est peu abondant dans les liquides extracellulaires.

Le ***calcium*** se trouve réparti dans la matière vivante sous deux états : le calcium *soluble* des humeurs, en partie diffusible (c'est-à-dire libre) sous forme ionisée Ca^{2+}, ou sous forme complexée et en partie non diffusible car lié aux protéines ; le calcium *insoluble,* carbonate et phosphate des coquilles et du squelette, plus rarement oxalate, tartrate, etc., dans les vacuoles végétales. Les deux formes du calcium sont d'ailleurs en équilibre et s'échangent de façon continuelle. Cet élément, au rôle à la fois plastique et catalytique (***Ex.*** : rôle de Ca^{2+} dans la coagulation), intervient également en association avec les autres cations dans la perméabilité et l'excitabilité cellulaires, d'où la nécessité d'utiliser en physiologie des solutions équilibrées pour ces différents ions.

III. COMPOSITION ET PROPRIÉTÉS DES SOLUTIONS

A. Composition des solutions

La composition quantitative d'une solution peut être précisée de nombreuses façons.

— Les unes, basées sur l'évaluation de la masse de chaque constituant.

Ex. : La concentration en masse d'un constituant A, notée ρA, est le quotient de la masse du constituant A par le volume du mélange.

— Les autres, liées au nombre de particules (moles ou moles d'ions) présentes pour chaque constituant.

Ex. :La concentration molaire ou molarité d'un constituant A, notée C_A ou [A] est le quotient du nombre de moles du constituant A par le volume du mélange.

— D'autres types d'évaluation sont fréquents en biochimie. Ainsi pour faciliter les comparaisons et pour établir des répartitions ou des bilans ioniques (ionogrammes) on utilise parfois la notion d'*équivalent* qui fait intervenir la masse et l'électrovalence de l'ion.

$$1 \text{ équivalent} = \frac{\text{masse de l'ion}}{\text{valence de l'ion}}$$

$$1 \text{ Eq } Cl^- = 35{,}5 \text{ g}, \quad 1 \text{ Eq } Na^+ = 23 \text{ g},$$

$$1 \text{ Eq } Ca^{2+} = \frac{40}{2} = 20 \text{ g}.$$

Plutôt que l'équivalent lui-même, c'est le *milliéquivalent* qui est l'unité la plus classique car elle conduit à des valeurs plus simples

$$1 \text{ mEq} = 10^{-3} \text{ Eq}.$$

Le quotient de la concentration en masse de l'ion, évaluée en mg/l, par la valeur du milliéquivalent exprime le titre en milliéquivalents par litre.

Ex. : Le plasma renferme 3,65 g/l d'ion Cl^- ce qui correspond à

$$\frac{3\,650}{35{,}5} = 103 \text{ mEq/l}.$$

B. Propriétés des solutions

Les propriétés des solutions sont extrêmement nombreuses, mais seulement trois d'entre elles, nécessaires à la suite de l'étude, seront rapidement évoquées.

1. LA FORCE IONIQUE

La force ionique d'une solution dépend à la fois de la concentration et de l'électrovalence des ions selon la formule :

$$I = \frac{1}{2} \sum m_i z_i^2$$

dans laquelle :

— m_i est la molalité c'est-à-dire le quotient du nombre de moles d'un corps dissous par la masse du solvant. Les solutions aqueuses utilisées étant généralement diluées, on remplace souvent la molalité par la molarité.

— Z_i est la charge des ions.

Ex. : Force ionique d'une solution 0,01 mol/l de chlorure de sodium :

$$NaCl \rightarrow Na^+ + Cl^-$$

d'où :

$$I = \frac{1}{2}\left(0{,}01 \times 1^2 + 0{,}01 \times 1^2\right) = 0{,}01 \text{ mol/l}$$

— Force ionique d'une solution 0,01 mol/l de chlorure de calcium :

$$CaCl_2 \rightarrow Ca^{2+} + 2\ Cl^-$$

$$I = \frac{1}{2}\left(0{,}01 \times 2^2 + 0{,}02 \times 1^2\right) = 0{,}03 \text{ mol/l}.$$

La force ionique conditionne, en particulier, la solubilité et la mobilité des molécules protéiques ainsi que les dissociations.

2. LA PRESSION OSMOTIQUE

Les molécules et les ions présents dans une solution participent, en association au développement de la pression osmotique et, par suite, aux phénomènes d'osmose.

D'après la loi de Van't Hoff :

$$\pi = \frac{ni}{V} RT$$

formule dans laquelle π désigne la pression osmotique, T la température absolue, R la constante des gaz parfaits, V le volume occupé par les $n\ i$ particules. S'il s'agit de molécules, $i = 1$ et n représente le nombre de molécules. Pour les molécules totalement dissociées, n représente le nombre de molécules et i le nombre d'ions fournis par chaque molécule. Enfin dans le cas d'une dissociation partielle, il faut faire intervenir le coefficient de dissociation.

Ces particules osmotiquement actives, molécules ou ions, sont souvent évaluées en **osmoles (osM)** ou **milliosmoles (mosM)** ; 1 mosM = 10^{-3} osM. Une osmole correspond à la mase en grammes d'une particule active.

Cette notion diffère donc de celle d'équivalent ; ici la *charge n'intervient pas.*

Ex. :
1 osmole d'urée = 60 g d'urée ;
1 osmole de glucose = 180 g de glucose ;
1 osmole de Na^+ = 23 g de sodium ;
1 osmole de Ca^{2+} = 40 g de calcium.

Le nombre d'osmoles de chaque substance contenues dans une solution s'obtient en divisant le titre massique de la solution par la masse d'une osmole.

3. LE POUVOIR TAMPON

Considérons : de l'eau pure, une solution formée par un mélange équimoléculaire d'acétate de sodium et d'acide acétique 0,1 molaire et une autre solution acéto-acétique équimoléculaire, 1 molaire. Dans un volume donné de chacune des solutions, ajoutons un acide fort (HCl) ou une base forte (NaOH) en suivant les variations de pH à l'aide d'un pH-mètre. Nous obtenons ainsi trois courbes (fig. 2.8).

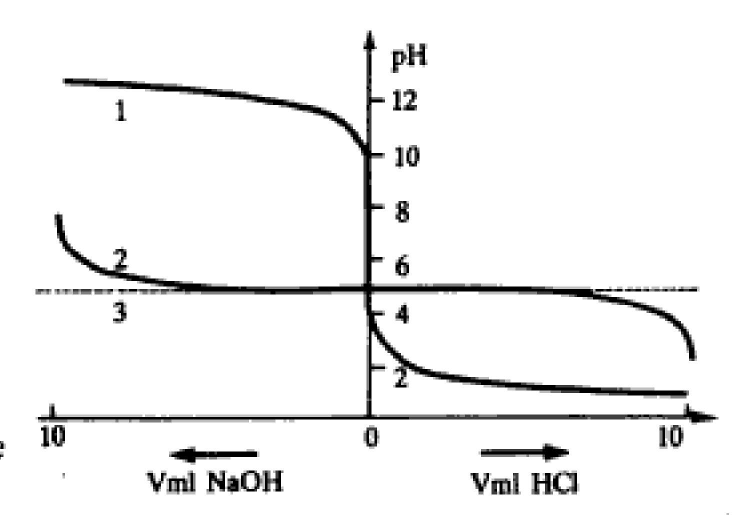


Figure 2.8 Effet tampon (d'après Benezech). 1. eau pure ; 2. solution acéto-acétique 0,1 mol/l; 3. solution acéto-acétique 1 mol/l.

Leur comparaison met en évidence les résultats suivants :

— Les solutions acéto-acétiques amortissent les variations de pH ; elles les tamponnent.

— L'effet tampon est plus ou moins important et nous pouvons le caractériser par un **pouvoir tampon** *T* ou coefficient tampon lié à la pente de la courbe. On l'évalue habituellement par le rapport :

$$T = \frac{\Delta \nu}{\Delta \text{pH}}.$$

Ce pouvoir tampon *varie avec la concentration* du système considéré et il est *maximum pour le mélange équimoléculaire* (zone la plus horizontale des courbes).

— Le pH d'une solution tampon ne varie pratiquement pas avec la dilution. Les courbes 2 et 3 sont très voisines.

L'effet tampon résulte dans cet exemple du mélange *acide et sel de base forte de l'acide faible*

$$\left\{\begin{array}{l} CH_3\text{—}COONa \rightarrow CH_3COO^- + Na^+ \\ \qquad CH_3COOH \rightleftarrows \ \ H^+ \end{array}\right.$$

Les variations des concentrations en ions H^+ ou OH^- entraînent un déplacement de l'équilibre 1, dans un sens ou dans l'autre, ce qui a pour conséquence d'amortir les variations de pH. Le même effet peut être obtenu à partir d'un *mélange base faible et sel d'acide fort de la base faible* (***Ex.*** : NH_3, NH_4Cl).

La nature du mélange et ses proportions permettent de faire varier le pH de la solution tampon.

Parmi les sels minéraux, deux systèmes tampons participent généralement au maintien du pH de la matière vivante. Ce sont : les *hydrogénocarbonates*

$$H^+ + HCO_3^- \rightleftarrows H_2CO_3 \rightleftarrows H_2O + CO_2$$

et les *phosphates*

$$H_2PO_4^- \rightleftarrows HPO_4^{2-} + H^+$$

3

Généralités sur les constituants organiques

Les molécules organiques qui entrent dans la composition de la matière vivante sont identiques en tout point à celles préparées par synthèse. D'ailleurs, l'origine même de la chimie organique n'est-elle pas biologique ? L'acide benzoïque, premier composé organique préparé à l'état pur, avait été extrait du benjoin végétal ; l'urée, une des premières substances synthétisées, est un constituant normal de l'urine.

La matière vivante renferme un nombre considérable de composés organiques dans lesquels sont représentées :

— les *différentes structures* appartenant aux séries aliphatique (à chaîne linéaire ou ramifiée), carbocyclique (aromatique, cyclanique, terpénique), hétérocyclique ;

— les *principales fonctions* : carbure, alcool, aldéhyde, cétone, acide carboxylique, amine, amide, etc.

Le plus souvent, il est possible de rattacher les composés naturels à quelques types moléculaires fondamentaux. Parmi les principaux, il faut citer : les sucres simples ou oses, les acides aminés, les acides gras, les hétérocycles azotés (noyaux pyrrole, pyrimidine, purine), l'isoprène, le noyau stérane. Par suite, les groupements fonctionnels caractéristiques de ces composés sont les mieux représentés. Ainsi les groupements hydroxyle, carbonyle, carboxyle et amine se retrouvent dans de nombreuses molécules.

Une *classification* basée uniquement sur la nature des fonctions ne saurait donc convenir d'autant plus que les composés, même les plus simples, renferment souvent plusieurs fonctions dans leurs molécules. Par ailleurs, cette classification ne tiendrait pas compte des rapports naturels qui lient les différents constituants et les composés macromoléculaires poseraient des problèmes insolubles. Aussi les biochimistes adoptent-ils un classement différent, moins rationnel mais plus naturel et plus pratique, basé :

— tantôt sur la structure et les propriétés (critère statique).

Ex. : Glucides, lipides, protides, acides nucléiques, stérols, porphyrines ;

— tantôt sur l'origine et le rôle dans les organismes (critère dynamique).

Ex. :Substrats, vitamines, enzymes, transporteurs, hormones ;

— tantôt enfin, sur des méthodes d'analyse immédiate (critère analytique).

Ex. : Fraction acidosoluble (soluble dans l'acide trichloracétique à froid) comprenant les petites molécules organiques et les sels minéraux.

Fraction liposoluble qui renferme les corps gras et les composés associés.

Fractions nucléique et protéique.

Dans la matière vivante, les constituants organiques se présentent schématiquement sous deux formes.

Des *molécules* relativement *petites, solubles, diffusibles.* Ce sont les types moléculaires appelés *monomères,* leurs dérivés et les produits peu condensés. Ils représentent des précurseurs, des formes de transport ou des intermédiaires dans les processus biochimiques.

Des *macromolécules structurées* qui sont les éléments plastiques et fonctionnels de la vie cellulaire. Elles sont issues d'une *polycondensation de monomères* généralement unis par un seul mode de liaison pour un groupe donné : liaison amide —CONH— ou peptidique pour les protides, liaison phosphodiester —O—Ⓟ—O— pour les acides nucléiques, liaison acétal ou osidique pour les glucides. La formation de telles liaisons nécessite l'élimination de molécules d'eau, ce qui rend indispensable un apport énergétique suffisant, compte tenu de l'hydratation de la matière vivante.

Une macromolécule peut être *homogène* (amidon, cellulose), constituée par polycondensation d'un seul type de monomère, ou *hétérogène* (protéines, acides nucléiques) si la polycondensation réunit plusieurs types de monomères. Dans ce dernier cas, la succession définie ou *séquence* de l'enchaînement des monomères conduit à une structure spatiale souvent complexe, à une individualité qui peut être parfois reconnue (propriétés antigéniques) ainsi qu'à des propriétés particulières, hormonales ou enzymatiques par exemple.

Ces macromolécules renferment, dans leur séquence, un contenu d'information qui peut s'exprimer par des structures et des propriétés spécifiques. Cette notion d'information peut se concevoir aisément par analogie. A partir des monomères A, B, C, etc., les successions AAA... ou CCC... n'ont guère de signification, au contraire, les séquences BANC, TABLE... renferment une information précise.

I. L'ASYMÉTRIE MOLÉCULAIRE

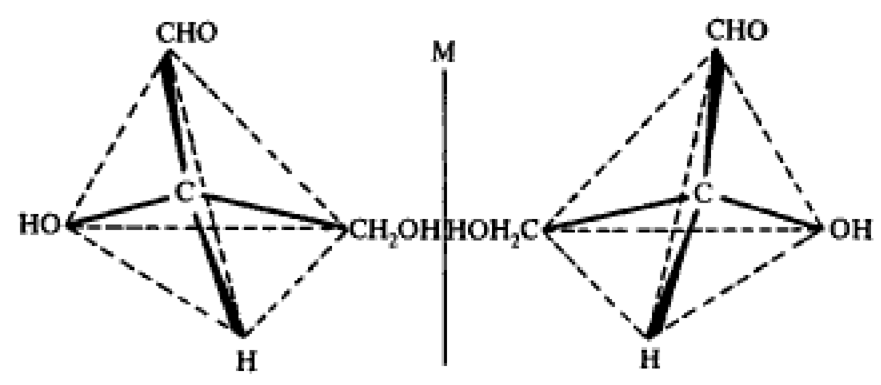
Les constituants biochimiques présentent les différentes formes d'isomérie :
— isomérie plane : de constitution ou de position ;
— isomérie stérique : optique et géométrique.

La plus intéressante, dans ce domaine, est l'isométrie optique des molécules dépourvues de toute symétrie. Elle est pratiquement toujours liée à la présence de ***carbone asymétrique*** dans la molécule et se traduit par l'existence d'un *pouvoir rotatoire*.

Un carbone est dit asymétrique, lorsque les quatre valences de l'atome sont liées à des atomes ou à des radicaux tous différents.

— Si une molécule, comme le glycéraldéhyde par exemple (fig. 3.1), renferme un carbone asymétrique, il lui correspond deux *isomères* ou *antipodes optiques* actifs sur la lumière polarisée ; l'un est *lévogyre*, l'autre *dextrogyre*. Ces deux isomères ont les mêmes propriétés chimiques et physiques à l'exception des pouvoirs rotatoires spécifiques qui sont égaux en valeur absolue, mais de signes contraires.

a) formules spatiales :



b) formules planes en projection (selon Fischer) :

Forme D (+)	M	Forme L (−)
CHO H—C—OH CH₂OH		CHO HO—C—H CH₂OH

Figure 3.1 Inverses optiques. Cas du glycéraldéhyde.

La molécule de chaque isomère actif, représentée dans l'espace, ne possède aucune symétrie et son inverse optique, qui ne lui est pas superposable, se présente comme son image dans un miroir plan (fig. 3.1).

Le mélange en parties égales de deux antipodes optiques, encore appelés *inverses optiques* ou *énantiomères,* constitue le *racémique,* isomère inactif par compensation mais dédoublable en ses composants actifs. L'opération de résolution du mélange racémique en ses deux énantiomères est rendue difficile par suite de l'identité des propriétés de ceux-ci. On y parvient par divers procédés physiques, chimiques ou biologiques : cristallisation sélective, destruction de l'un des antipodes par un micro-organisme ou une enzyme (les réactions biochimiques sont très sélectives), action d'un réactif optiquement actif conduisant à des composés qui ne sont plus énantiomorphes.

— Par généralisation, si une molécule renferme *n* carbones asymétriques, il pourra exister au maximum 2^n formes actives, pour moitié dextrogyres et pour moitié lévogyres ainsi que 2^{n-1} mélanges racémiques résultant du mélange en parties égales de deux énantiomères. Toutefois, ces nombres peuvent être réduits si l'un des isomères présente un plan de symétrie par suite de la répartition particulière des carbones asymétriques. La forme symétrique est optiquement inactive, non dédoublable ; elle porte le nom de *forme « méso »* ou de racémique par constitution.

Ex. : L'acide tartrique HOOC—CHOH—CHOH—COOH a ses deux carbones secondaires asymétriques ; on prévoit donc $2^2 = 4$ isomères actifs et $2^1 = 2$ mélanges racémiques. En fait l'expérience montre qu'il n'y a qu'une paire d'énantiomères et le mélange racémique correspondant, auxquels il faut ajouter un isomère méso non actif et non dédoublable car il possède un plan de symétrie.

— Il n'est pas possible, à priori, de faire correspondre une formule spatiale ou en projection avec une forme lévogyre ou dextrogyre ; autrement dit de connaître la configuration réelle, absolue, de chaque isomère.

Cette détermination est réalisable mais nécessite dans chaque cas un travail considérable. Aussi, à partir de configurations absolues connues, procède-t-on par corrélations, c'est-à-dire en établissant la configuration d'un composé par rapport à celle, déjà connue, d'un autre grâce à des réactions ne faisant pas participer les liaisons du carbone asymétrique.

Le composé de référence choisi est le glycéraldéhyde $CH_2OH—CHOH—CHO$ possédant un carbone asymétrique et de configuration absolue connue. L'isomère dextrogyre (+), dont le OH du carbone asymétrique figure à droite dans la formule en projection est symbolisé *D*, l'isomère lévogyre *L*. Il est possible de passer du glycéraldéhyde à l'acide lactique selon la succession,

$$\begin{matrix} CHO \\ | \\ H—C—OH \\ | \\ CH_2OH \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} COOH \\ | \\ H—C—OH \\ | \\ CH_2OH \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} COOH \\ | \\ H—C—OH \\ | \\ CH_2Br \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} COOH \\ | \\ H—C—OH \\ | \\ CH_3 \end{matrix}$$

Acide lactique

à laquelle ne participe pas le carbone asymétrique. L'acide lactique obtenu est lévogyre (détermination expérimentale), sa configuration est du type *D* (OH à droite). C'est là l'origine des **séries D et L** utilisées en biochimie à propos des isomères optiques. A l'exception du glycéraldéhyde, *ces lettres n'ont aucun rapport avec le signe du pouvoir rotatoire de la substance.*

II. LES STRUCTURES NON CONJUGUÉES ET CONJUGUÉES

Les molécules polyatomiques peuvent être divisées schématiquement en deux grandes catégories, les *molécules non conjuguées* et les *molécules conjuguées.*

A. Les molécules non conjuguées

Elles sont formées uniquement de liaisons simples, ou tout au moins les doubles liaisons et les doublets électroniques libres sont séparés les uns des autres par plusieurs liaisons simples. Ces molécules peuvent être considérées comme une *juxtaposition de liaisons diatomiques localisées* dont les caractéristiques, précisées dans le tableau II, p. 10, demeurent sensiblement constantes.

Les molécules non conjuguées ont une structure spatiale qui peut être représentée à l'aide des valences dirigées et leur contenu énergétique peut être calculé à partir des énergies de liaison.

L'éthanol CH_3—CH_2OH est formé de cinq liaisons σ C—H, d'une liaison σ C—C, d'une liaison σ C—O et d'une liaison σ OH ; sa formule développée spatiale et son contenu énergétique peuvent être déterminés avec précision.

Cependant, chaque liaison est influencée par les atomes et les radicaux voisins qui modifient plus ou moins la répartition du doublet de liaison et par suite la polarité. Cette influence, appelée *effet inductif,* dépend à la fois de la nature du radical inducteur, de l'aptitude à subir cette polarisation, c'est-à-dire de la polarisabilité de la liaison et de la distance qui les sépare. L'effet inductif a pour conséquence une légère modification de la forme moléculaire spatiale, preuve d'une certaine flexibilité du modèle moléculaire.

— L'acide monochloracétique CH_2Cl—COOH $\left(K_A = 155.10^{-5}\right)$ est un acide plus fort que l'acide acétique CH_3—COOH $\left(K_A = 1{,}8.10^{-5}\right)$. Par l'effet inductif, le chlore attracteur d'électrons accroît la polarité des liaisons. L'effet se propage de liaison en liaison et conduit à un déplacement général des électrons vers le chlore. La liaison O—H devient plus polaire, ce qui facilite la protonisation de l'atome d'hydrogène. Le même effet renforcé explique la force croissante des acides di- et trichloracétiques.

H, O, Cl←C←C←O←H, H (avec C=O)
Ac. monochloracétique

Cl, O, Cl←C←C←O←H, Cl (avec C=O)
Ac. trichloracétique

L'importance de l'effet inductif dépend de l'atome ou du radical (par rapport à l'hydrogène, les groupements NH_2 et OH sont *attractifs,* les radicaux méthyle, éthyle, isopropyle de plus en plus *répulsifs*) et de la liaison qui va subir la polarisation (les liaisons π sont plus polarisables que les liaisons σ, les électrons étant moins liés dans les premières).

— Dans la série des dérivés monochlorés de l'acide butyrique (qui sont plus forts que l'acide butyrique) CH_3—CH_2—CHCl—COOH, CH_3—CHCl—CH_2—COOH, CH_2Cl—CH_2—CH_2—COOH, l'acidité décroît avec l'éloignement du chlore. L'effet attractif de celui-ci est atténué par un *effet d'écran* des groupements CH_2. Il devient pratiquement nul au-delà de trois liaisons σ. Cela ne se produit pas si une double liaison, avec électrons π facilement polarisables, assure un relais dans le composé.

CH_2Cl—CH_2—CH_2—COOH
ac. chlorobutyrique
$K_A = 3{,}2 \,.\, 10^{-5}$

CH_2Cl—CH═CH—COOH
ac. chlorocrotonique
$K_A = 126 \,.\, 10^{-5}$

B. Les molécules conjuguées

Elles renferment plusieurs doubles liaisons partant de carbones adjacents ou voisines d'atomes porteurs de doublets libres. Si l'exemple le plus classique est la molécule de benzène, des structures conjuguées résultent également de la présence de certains groupements fonctionnels.

Ex. : Le carboxyle —COOH.

Dans de tels composés, la *constance des caractéristiques des liaisons* (longueur, énergie, polarité) *ne se retrouve plus*. Les différentes liaisons sont intermédiaires entre les types simple et double, il n'y a *pas de localisation précise*.

Leurs électrons doivent en effet être répartis en deux groupes :

— les *électrons* **σ**, localisés, formant le squelette des liaisons simples dirigées ;

— les *électrons* **π**, délocalisés, formant un nuage réparti sur l'ensemble de la molécule, le « pool » des électrons **π**. Plus faiblement fixés que les précédents, ces électrons π sont *responsables des propriétés particulières de ces molécules.*

La répartition des électrons π a de nombreuses conséquences :

— Les molécules ne peuvent pas être représentées par un schéma simple avec doubles liaisons localisées. *La molécule résonne* entre différents schémas, c'est-à-dire que sa structure vraie, qui est unique, est intermédiaire entre celles schématisées. On dit encore qu'il y a « *mésomérie* » entre elles toutes.

Parfois, on localise arbitrairement les liaisons en respectant la tétravalence du carbone ou bien, ce qui est préférable, on adopte un symbole conventionnel ou enfin on indique les principales formules résonnantes admises bien que la structure réelle soit unique, intermédiaire entre ces formules *mésomères* limites.

— La *répartition des électrons* π sur l'ensemble de la molécule fait que toute modification en un point de cette molécule a pour conséquence une redistribution des électrons π et, par suite, une répercussion sur la molécule entière : c'est l'*effet mésomère*.

— La distribution de ce pool d'électrons π entraîne pour la molécule, et pour chacun des atomes, des *propriétés énergétiques et réactionnelles particulières.* Ainsi une molécule conjuguée a une énergie supérieure à celle calculée à partir des liaisons localisées. Ce supplément d'énergie nommé *énergie de délocalisation* lui confère une plus grande stabilité qui peut être déterminée expérimentalement *(énergie de résonance)*. Pour chaque atome, on définit un *indice de charge électrique mobile* mesurant la quantité d'électrons π se trouvant autour de lui. Pour chaque liaison il est possible d'évaluer un *indice de liaison mobile* qui est une traduction du caractère

double partiel de la liaison. Pour une liaison simple σ cet indice est nul, pour une liaison double $\sigma + \pi$ il est égal à 1, pour une liaison C—C du benzène cet indice vaut 0,46.

De nombreux autres indices ont été définis, ils permettent d'interpréter la réactivité et le comportement des molécules conjuguées mais aussi laissent prévoir de *grandes possibilités réactionnelles*.

— Enfin, la conjugaison des doubles liaisons produit un déplacement des bandes d'absorption spectrale de l'ultraviolet vers le visible *(effet bathochrome)* pour les états électroniquement excités.

En biochimie, à l'exception des glucides, des lipides et des stéroïdes (en partie seulement), tous les autres composés ont une structure conjuguée, souvent même très fortement, comme c'est le cas pour les porphyrines et les hétérocycles azotés.

4
Les protides

De nombreuses substances telles que l'ovalbumine, le gluten, l'insuline, l'hémoglobine, l'amylase, etc., à priori très différentes les unes des autres par leur répartition et leurs propriétés, possèdent cependant un certain nombre de caractères communs.

— Présence d'*azote* (facilement mis en évidence par action de la chaux sodée) et souvent de *soufre.*

— Réactions colorées caractéristiques comme la *réaction du biuret* ou la *réaction xanthoprotéique.*

Ces points communs traduisent une homogénéité de leur structure chimique que confirme l'analyse chromatographique de leur hydrolysat. Dans tous les cas, l'hydrolyse totale aboutit à un mélange de composés à structure caractéristique, les *acides aminés* ou *amino-acides.*

Le terme de protides désigne donc l'ensemble des acides aminés naturels et de leurs produits de condensation répartis en deux sous-groupes par ordre de complexité croissante : les *peptides* et les *protéines.* Ces dernières sont elles-mêmes subdivisées en holoprotéines formées exclusivement (ou presque) par un assemblage d'acides aminés et en *hétéroprotéines* constituées d'acides aminés mais aussi de substances variées groupées en une unité distincte, non protidique, appelée groupement prosthétique, dont la présence entraîne l'apparition de propriétés nouvelles. D'où le tableau :

PROTIDES		
non hydrolysables	hydrolysables	
= *amino-acides* (monomères)	*peptides + holoprotéines* = condensation d'acides aminés	*hétéroprotéines* = holoprotéines + groupement prostétique

Les protides sont des composés quaternaires (C, H, O, N) renfermant le plus souvent du soufre. Ils sont de structure complexe, variée, formant généralement de grosses molécules dont la structure exacte est encore incomplètement connue dans de nombreux cas.

Les protides sont des constituants essentiels et caractéristiques de la matière vivante (protide vient du grec protos = premier). Ils sont importants quantitativement car présents dans toutes les structures vivantes dont ils constituent la trame (50 à 80 % du poids sec). Ils sont importants quantitativement car c'est à ce groupe qu'appartiennent les enzymes et de nombreuses structures permettant l'accomplissement de fonctions vitales (régulation, défense, motricité, etc.).

Les acides aminés

I. FORMULE GÉNÉRALE

Un acide aminé est, par définition, un composé renfermant dans sa molécule une fonction amine et une fonction acide. De plus, pour les acides aminés naturels, la fonction amine est généralement située en position α par rapport au carboxyle ; c'est une fonction amine primaire.

Les amino-acides naturels sont donc des *acides α-aminés* de formule générale :

$$R{-}CH(NH_2){-}COOH \quad \text{ou} \quad R{-}CH\begin{matrix} \diagup NH_2 \\ \diagdown COOH \end{matrix}$$

Une vingtaine d'entre eux sont rencontrés de façon courante dans les hydrolysats de protéines. Ils sont appelés *acides aminés « ordinaires »* ou *« courants »* et l'usage en biochimie leur a consacré un nom commun, généralement à suffixe « ine », rappelant l'origine ou l'une des propriétés. Ils répondent à cette formule générale à deux exceptions près, la ***proline*** et l'***hydroxyproline***, beaucoup plus rare, qui sont plutôt des imino-acides bien que la fonction azotée ne soit pas une imine vraie, mais un hétérocycle (noyau pyrrolidine).

D'autres acides aminés naturels de structure plus variée sont exceptionnels ou absents dans les protéines, mais présents dans d'autres constituants. Ils sont appelés acides aminés *« rares »* ou *« occasionnels »*.

H_2C—CH_2 ; H_2C CH—$COOH$; N ; H

Proline
(Pro en abrégé)

HO—HC—CH_2 ; H_2C CH—$COOH$; N ; H

Hydroxyproline
(Hypro)

II. PRINCIPAUX ACIDES AMINÉS NATURELS

Les acides aminés peuvent être classés d'après la structure et la complexité de leur chaîne latérale R. Parmi les différentes classifications possibles, l'une des plus intéressantes repose sur la polarité et les possibilités d'ionisation de cette chaîne.

A. Acides aminés ordinaires

1. *R* EST UN RADICAL HYDROCARBONÉ APOLAIRE

Aliphatique. — La ***glycine*** (acide α-amino-acétique ou amino-éthanoïque). C'est le plus simple des acides aminés pour lequel *R* = H.

Son ancien nom de glycocolle, soit « sucre de colle », rappelle sa saveur sucrée et le fait qu'il a été isolé la première fois à partir d'un hydrolysat de gélatine. Il est très répandu, présent dans toutes les protéines et abondant dans certaines d'entre elles (la fibroïne de la soie en contient 40 %). Enfin, de nombreux dérivés de la glycine présentent un grand intérêt biochimique.

$H{-}CH(NH_2){-}COOH$ $\quad$ $CH_3{-}CH(NH_2){-}COOH$

Glycine (Gly) Alanine (Ala)

L'***alanine*** ou acide α-amino-propionique est l'homologue supérieur de la glycine.

C'est le plus simple des acides aminés à trois atomes de carbone duquel on peut faire dériver les autres par substitution de divers groupements à un hydrogène du radical méthyle. L'alanine est également très répandue et son isomère β est l'un des rares amino-acides naturels qui ne soit pas α.

La ***valine,*** la ***leucine*** et l'***isoleucine.***

L'homologue supérieur en C_4 de l'alanine ne se rencontre pas. Les termes en C_5 et C_6 sont des amino-acides fortement apolaires, à chaîne ramifiée.

$(CH_3)_2CH{-}CH(NH_2){-}COOH$ $\quad$ $(CH_3)_2CH{-}CH_2{-}CH(NH_2){-}COOH$ $\quad$ $(CH_3{-}CH_2)(CH_3)CH{-}CH(NH_2){-}COOH$

Valine (Val) Leucine (Leu) Isoleucine (Ile)

Tous les trois sont des constituants des protéines, toujours en proportions assez faibles. Ces acides aminés, indispensables à la nutrition des animaux supérieurs et dont ils sont incapables de faire la synthèse sont qualifiés d'*amino-acides essentiels ou indispensables.* Cette notion, comme celles d'oligoélément et de vitamine, dépend de l'espèce considérée et de la période de développement.

Aromatique. — La ***phénylalanine,*** qui résulte de la substitution d'un radical phényl à un hydrogène de l'alanine est l'un des trois amino-acides aromatiques naturels.

$C_6H_5{-}CH_2{-}CH(NH_2){-}COOH$ ou $(\varphi){-}CH_2{-}CH(NH_2){-}COOH$

Phénylalanine (Phé)

C'est également un composé fortement apolaire et indispensable.

2. *R* EST UNE CHAÎNE LATÉRALE POLAIRE

La polarité résulte de l'existence dans *R* d'une fonction supplémentaire polaire (alcool, thiol, phénol) trop faiblement dissociée pour être considérée comme ionisable dans les conditions normales du milieu cellulaire.

La ***tyrosine*** (*p*-hydroxyphénylalanine) et le ***tryptophane*** (indolalanine) sont les deux autres acides aminés aromatiques naturels.

$HO-\langle \varphi \rangle-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

Tyrosine (Tyr)

Indole$-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

Tryptophanne (Trn) (*)

La présence du noyau aromatique confère à ces amino-acides des propriétés physiques et chimiques particulières (p. 54 et 73). La tyrosine, présente dans la plupart des protéines, est à l'origine de composés biochimiques importants (hormones thyroïdiennes, adrénaline, mélanines). Le tryptophane, très faiblement polaire, dont le nom rappelle sa découverte dans un hydrolysat trypsique, est rapidement détruit en milieu acide. Généralement présent dans les protéines, mais à un taux très faible, il est indispensable pour les animaux supérieurs.

La ***sérine*** et la ***thréonine*** possèdent une fonction alcool dans leur molécule, ce qui leur permet d'être estérifiées, en particulier par l'acide phosphorique.

$HOCH_2-CH(NH_2)-COOH$

Sérine (Ser)

$CH_3-CH(OH)-CH(NH_2)-COOH$

Thréonine (Thr)

La thréonine a été le premier acide aminé reconnu être indispensable.

La ***cystéine*** et la ***cystine*** sont des amino-acides soufrés.

$HS-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

Cystéine (Cys-SH)

$S-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
$|$
$S-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

Cystine (Cys-S-S-Cys)

(*) Par simplification, les doubles liaisons des hétérocycles sont réprésentées localisées.

La cystéine renferme un groupement thiol qui joue un rôle important dans l'activité de certaines enzymes. Par oxydation, il y a condensation avec une deuxième molécule pour former la cystine. Le passage d'une forme à l'autre peut être schématisé :

$$\underset{\textit{Forme thiol réduite}}{2\,R\text{—SH}} \rightleftarrows \underset{\textit{Forme disulfure oxydée}}{R\text{—S—S—}R + 2\,H^+ + 2\,e^-}$$

Il constitue un système d'oxydoréduction qui devient réversible dans certaines conditions.

Ces deux amino-acides sont des constituants des protéines, généralement peu abondants. La cystine entre dans la composition des protéines des tissus de protection ; elle intervient également dans la structure des molécules protéiques, les ponts disulfures unissant deux points de ces molécules.

La ***méthionine,*** également soufrée, est un acide aminé indispensable, peu abondant dans les protéines.

$$CH_3\text{—S—}CH_2\text{—}CH_2\text{—}CH(NH_2)\text{—}COOH$$

Méthionine (Met)

La méthionine est stable en milieu alcalin contrairement à la cystéine et à la cystine qui sont désulfurées. C'est le plus important des acides aminés soufrés, il intervient dans de nombreuses synthèses biochimiques comme donneur du groupement méthyle.

Dans ce groupe des acides aminés polaires, il conviendrait d'ajouter l'hydroxyproline alors que la proline figurerait dans le précédent.

3. *R* CONTIENT UN GROUPEMENT IONISABLE

Il peut s'agir d'un deuxième carboxyle ou d'un groupement à caractère basique (amine, guanidine, noyau imidazole).

Les ***acides aspartique et glutamique*** sont des amino-acides dicarboxyliques constituants des protéines :

$$HOOC\text{—}CH_2\text{—}CH(NH_2)\text{—}COOH \qquad HOOC\text{—}CH_2\text{—}CH_2\text{—}CH(NH_2)\text{—}COOH$$

Acide aspartique (Asp) — Acide glutamique (Glu)

Leurs mono-amides, asparagine (Asp-NH_2 ou Asn) et glutamine (Glu-NH_2 ou Gln) jouent un rôle essentiel dans le transport et la mise en réserve de l'azote aminé avec passage possible à l'ammoniac.

$$H_2NOC\text{—}CH_2\text{—}CH_2\text{—}CH(NH_2)\text{—}COOH$$

Glutamine
(le suffixe ine désigne ici l'amide)

L'asparine est plus abondante chez les végétaux, la glutamine chez les animaux.

La lysine, l'arginine et l'histidine sont des acides aminés basiques à six atomes de carbone d'où l'ancienne dénomination de « bases hexoniques ». Tous les trois entrent dans la composition des protéines et sont indispensables pour l'homme et de nombreuses espèces animales.

La lysine

$$H_2N{-}CH_2{-}(CH_2)_3{-}CH(NH_2)COOH \qquad \text{(Lys)}$$

est diaminée, d'où son caractère basique. Elle fait défaut dans quelques protéines végétales (zéine du Maïs).

L'arginine

$$NH{=}C(NH_2){-}NH{-}(CH_2)_3{-}CH(NH_2)COOH \qquad \text{(Arg)}$$

possède un groupement guanidine qui peut se combiner à l'acide phosphorique. L'arginine phosphate a un rôle important dans la contraction musculaire chez les Invertébrés. Elle intervient dans le cycle de formation de l'urée ; les alcalis à chaud décomposent d'ailleurs l'arginine en urée et ornithine.

L'histidine

$$\underbrace{HC{=}C{-}NH{-}CH{=}N{-}}_{\text{noyau imidazole}}\; {-}CH_2{-}CH(NH_2)COOH \qquad \text{(His)}$$

renferme un noyau imidazole doué d'une grande réactivité à cause de sa structure électronique. Ce noyau participe à de nombreuses réactions biochimiques et à plusieurs processus physiologiques (transmission neuro-musculaire, contraction musculaire).

B. Acides aminés rares ou occasionnels

Dans ce groupe peuvent figurer :

— Des α-amino-acides présents seulement dans quelques protéines et à des taux très faibles ou seulement dans quelque organismes.

Ex. *:Hydroxyproline (formule, page 46)*
Hydroxylysine
Acide diaminopimélique.

$$H_2N—CH_2—CHOH—(CH_2)_2—CH(NH_2)—COOH$$

Hydroxylysine

$$HOOC—CH(H_2N)—(CH_2)_3—CH(NH_2)—COOH$$

Acide diaminopimélique

— Des α-amino-acides ou des formes β, γ aminées qui n'entrent pas dans la composition des protéines.

Ex. :

$$H_2N—CH_2—CH_2—COOH$$

β Alanine

$$H_2N—CH_2—CH_2—CH_2—COOH$$

Acide γ-aminobutyrique

$$O{=}C(NH_2)—NH—(CH_2)_3—CH(NH_2)—COOH$$

Citrulline

$$H_2N—(CH_2)_3—CH(NH_2)—COOH$$

Ornithine

— A la limite on peut inclure des *dérivés d'amino-acides.*
Ex. : la *thyroxine* (hormone thyroïdienne) :

$$HO—\varphi(I)_2—O—\varphi(I)_2—CH_2—CH(NH_2)—COOH$$

le *chloramphénicol* (antibiotique) et l'*acide p-aminosalicylique* ou PAS (antituberculeux) :

$$O_2N—\varphi—CHOH—CH(NH—CO—CHCl_2)—CH_2OH$$

Chloramphénicol

$$H_2N—\varphi(OH)—COOH$$

Acide p-aminosalicylique

III. PROPRIÉTÉS PHYSIQUES

A. Aspect

Les acides aminés sont des solides blancs cristallisés (fig. 4.1) qui se décomposent avant de fondre.

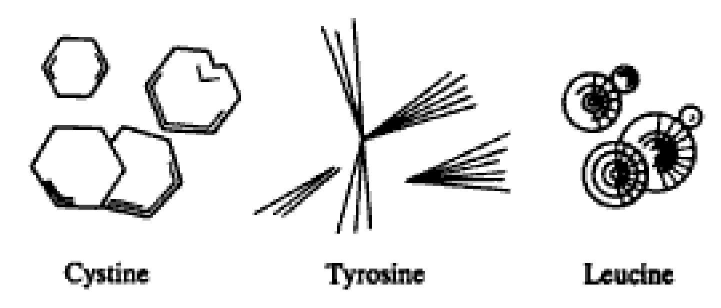


Figure 4.1 Cristaux d'acides aminés.

B. Solubilité

La solubilité aqueuse des acides aminés est en rapport avec leur structure polaire et dépend de plusieurs facteurs dont :

— la nature de la chaîne latérale *R*, en particulier de sa taille et de sa polarité. Ainsi les premiers termes aliphatiques sont bien solubles (glycine, alanine) ; par contre la leucine, la tyrosine, la cystine, etc., sont très peu solubles, elles cristallisent spontanément dans les hydrolysats digestifs ou bactériens et dans l'urine dès que leur concentration s'élève ;

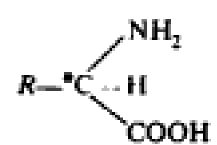
— le pH de la solution. La solubilité est minimum au point isoélectrique (p. 58) ;

— la nature et la concentration des ions éventuellement présents dans la solution.

La solubilité dans les solvants organiques est faible, mais variée et permet un fractionnement par les techniques de chromatographie.

C. Pouvoir rotatoire

Tous les amino-acides naturels, à l'exception de la glycine, possèdent un *carbone asymétrique* :



Certains possèdent en plus un carbone asymétrique dans la chaîne latérale (thréonine par exemple), ce qui augmente le nombre d'isomères possibles.

Les solutions d'acides aminés sont donc optiquement actives, mais le pouvoir rotatoire n'a pas d'application pratique courante car il change non seulement de valeur, mais aussi de signe selon les conditions opératoires (nature du solvant, pH du milieu). Aussi pour repérer la forme naturelle d'un amino-acide utilise-t-on les données conventionnelles déduites du glycéraldéhyde par corrélation de configuration (p. 38).

D glycéraldéhyde		Acide D lactique		D amino-acide		L amino-acide
H–C=O		C(=O)–OH		C(=O)–OH		C(=O)–OH
H–C–OH	→	H–C–OH	→	H–C–NH_2	→	H_2N–C–H
CH_2OH		CH_3		*R*		*R*

Les variations du pouvoir rotatoire spécifique de la leucine selon le pH, illustrent bien l'influence des conditions opératoires :

$$[\alpha]_D^{20°C} = +14{,}6° \text{ dans une solution d'HCl 1 mol/l}$$
$$[\alpha]_D^{20°C} = -10{,}7° \text{ dans l'eau}$$
$$[\alpha]_D^{20°C} = +7{,}6° \text{ dans une solution de NaOH 1 mol/l}$$

Les acides aminés naturels appartiennent à la série *L*, les formes *D* sont exceptionnelles et se rencontrent surtout chez les bactéries.

La thréonine possède deux centres de chiralité, il y a, en conséquence 4 isomères. Les stéréo-isomères naturels s'appellent *L* et *D* thréonine, les deux autres stéréo-isomères se voient attribuer le préfixe allo :

L Thr	D Thr	L allo-Thr	D allo-Thr
COOH	COOH	COOH	COOH
H_2N–C–H	H–C–NH_2	H_2N–C–H	H–C–NH_2
H–C–OH	HO–C–H	HO–C–H	H–C–OH
CH_3	CH_3	CH_3	CH_3

D. Absorption ultraviolette

Les acides aminés présentent une absorption importante à une longueur d'onde inférieure à 230 nm, mais de plus, certains d'entre eux absorbent entre 250 et 300 nm par suite de la structure de leur chaîne latérale (fig. 4.2). Ce sont surtout le triptophane par son noyau indole (λ ≠ 280 nm) et la tyrosine par son noyau phénol

(λ # 275 nm) qui présentent cette particularité permettant des dosages spectrophotométriques.

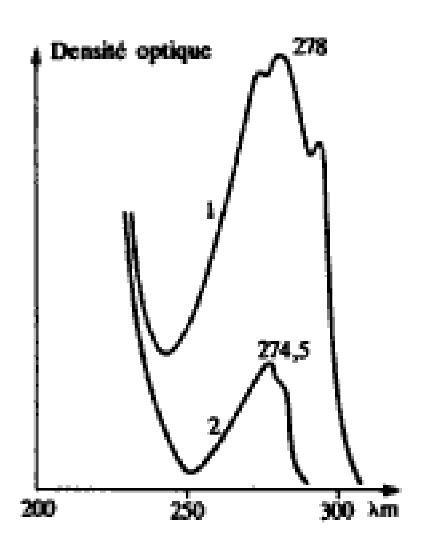


Figure 4.2 Spectres d'absorption dans l'ultraviolet (d'après P. Desnuelle).
Solutions dans HCl 0.1 mol/l. 1. tryptophane ; 2. tyrosine.

Les acides aminés aromatiques confèrent aux protéines dont ils sont des constituants la propriété d'absorber la lumière ultraviolette pour des longueurs d'onde voisines de 280 nm. Cette propriété se prête à certaines applications analytiques, en particulier la détection en sortie de colonne des protéines en chromatographie liquide.

IV. PROPRIÉTÉS CHIMIQUES

Ces propriétés sont nombreuses par suite de la présence au sein d'une même molécule d'un carboxyle, d'une fonction amine en position α et d'une chaîne latérale plus ou moins complexe. Seules les plus importantes, pour l'analyse ou la suite de notre étude, seront envisagées.

A. Ionisation

C'est une propriété physicochimique essentielle car elle conditionne le comportement des amino-acides, et par généralisation celui des protéines, en solution aqueuse selon le pH du milieu.

1. NOTIONS PRÉLIMINAIRES

Sans entreprendre une étude des réactions acido-basiques, il est nécessaire cependant de préciser quelques points.

Dans un but de simplification, nous confondrons en première approximation :

— les *concentrations molaires ou molarités* (nombre de moles ou d'ions-grammes par unité de volume) et les *activités* schématisées (×), bien que l'égalité ne soit valable qu'en solution très diluée. Ce qui revient à dire que nous négligerons les interactions entre les particules en solution ;

— (H^+) et (H_3O^+), en négligeant l'hydratation du proton, les ionisations se déroulant toujours en solution aqueuse. Nous aurons donc des relations :

$$H_2O \rightleftarrows H^+ + OH^-$$

avec $(H^+)(OH^-) = 10^{-14}$ à 25 °C pour l'eau et

$$pH = -\lg (H^+).$$

Enfin nous adopterons les *définitions de la théorie de Brönsted.*

Seront appelés acides tous les composés capables de céder un proton et bases tous les composés capables de capter un proton. Il en résulte que, si nous considérons la dissociation :

$$AH \rightleftarrows A^- + H^+ \qquad (1)$$

AH est un acide et A^- la base conjuguée de celui-ci. L'ensemble constitue un couple acide-base dans lequel plus l'acide sera fort (équilibre déplacé vers la droite) plus la base conjuguée sera faible et inversement.

Tableau III. Constantes de dissociation.

Acide	⇄	Base	+	H^+	K*a*	*p*Ka
HCl	⇄	Cl^-	+	H^+	> 1	—
H_2SO_4	⇄	HSO_4^-	+	H^+	> 1	—
HSO_4^-	⇄	SO_4^{2-}	+	H^+	3×10^{-2}	1,6
H_3PO_4	⇄	$H_2PO_4^-$	+	H^+	10^{-2}	2
CH_3COOH	⇄	CH_3COO^-	+	H^+	$1{,}9 \times 10^{-5}$	4,8
R—COOH	⇄	*R*—COO^-	+	H^+	10^{-4} à 10^{-6}	4 à 6
$H_2PO_4^-$	⇄	HPO_4^{2-}	+	H^+	2×10^{-7}	6,8
H_2CO_3	⇄	HCO_3^-	+	H^+	3×10^{-7}	6,7
HCO_3^-	⇄	CO_3^{2-}	+	H^+	6×10^{-11}	10,2
HPO_4^{2-}	⇄	PO_4^{3-}	+	H^+	$3{,}6 \times 10^{-13}$	12,4
NH_4^+	⇄	NH_3	+	H^+	$\simeq 10^{-10}$	10
R—NH_3^+	⇄	*R*—NH_2	+	H^+		
C_6H_5—OH	⇄	C_6H_5—O^-	+	H^+	10^{-7} à 10^{-10}	7 à 10
C_2H_5—OH	⇄	C_2H_5—O^-	+	H^+	$\simeq 10^{-18}$	18

Le pK. Si nous reprenons l'équilibre (1) ci-dessus correspondant à un acide faible, nous pouvons écrire d'après la loi des équilibres chimiques :

$$\frac{(A^-)(H^+)}{(AH)} = K_a \text{ (température constante)}. \quad (2)$$

Cette constante K_a peut traduire la force de cet acide. K_a est d'autant plus petit que l'acide AH est plus faible, moins dissocié. Par analogie avec la notation pH, nous pouvons poser $pK_a = -\lg K_a$. Cette nouvelle constante permet de classer, à l'aide de valeurs simples, les acides ou les acidités pour un acide polyprotique (tableau III).

Notons que si $(A^-) = (AH)$, c'est-à-dire à demi-salification pour un acide faible, $K_a = (H^+)$ d'où $pH = pK_a$. *Le* pK_a *correspond donc au* pH *de demi-salification de l'acide faible* par une base forte.

De plus, la relation (2) peut être écrite, en passant aux logarithmes,

$$\lg K_a = \lg (H^+) + \lg \frac{(A^-)}{(AH)}$$

soit

$$\boxed{pH = pK_a + \lg \frac{(A^-)}{(AH)}}.$$

Cette relation permet un calcul approché du pH d'un mélange acide faible (AH), base conjuguée (A^-), et inversement il est possible de prévoir l'état de dissociation (ou de salification) d'un acide faible connaissant le pH de sa solution.

Ex. :

• Pour $pH = pK_a - 2$, $\log (A^-)/(AH) = -2$ ou $(A^-)/(AH) = 10^{-2}$, l'acide est sous la forme AH à 1 % près.

• Pour $pH = pK_a - 1$, $\log (A^-)/(AH) = -1$ ou $(A^-)/(AH) = 10^{-1}$, l'acide est sensiblement pour 9/10 sous la forme AH et pour 1/10 sous la forme A^-.

• Pour $pH = pK_a$, $\log (A^-)/(AH) = 0$ ou $(A^-)/(AH) = 1$, c'est-à-dire $(A^-) = (AH)$.

• Les résultats seraient inversés pour $pH = pK_a + 1$ puis $pK_a + 2$. La salification d'un acide faible se réalise donc à 1 % près entre $pK_a - 2$ et $pK_a + 2$.

Considérons maintenant une base faible, NH_3 par exemple, l'ionisation correspond à l'équation simplifiée :

$$NH_3 + H_2O \rightleftarrows NH_4^+ + OH^- \quad \text{ou} \quad NH_3 + H^+ \rightleftarrows NH_4^+.$$

Base. *Acide conjugué.*

Il serait possible par analogie de définir une constante de dissociation basique K_b et un pK_b, mais cette valeur, d'après la notion de couple acide-base, n'est pas

indépendante du pK_a de l'acide conjugué. On démontre que :

$$K_a \cdot K_b = K_{eau} = 10^{-14} \text{ à } 25\ °C$$

soit

$$pK_a + pK_b = 14\ .$$

Cette dernière constante est donc inutile, il suffit pour caractériser complètement chaque couple de fournir la valeur de son pK_a : ce que nous ferons en remplaçant dorénavant la notation pK_a simplement par pK.

2. LES DEUX IONISATIONS

Tous les amino-acides possèdent au moins deux groupements ionisables.

Un carboxyle, dans lequel la liaison OH fortement polaire permet la protonisation de l'hydrogène :

$$-C(=O)-O-H \rightleftarrows -C(=O)-O^- + H^+$$

Acide — Base conjuguée

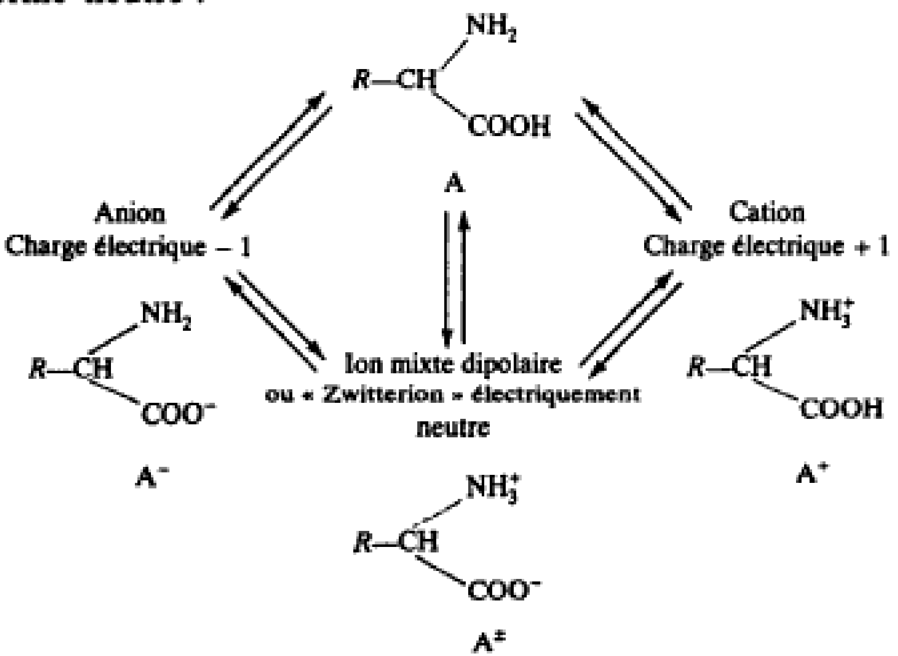
— ***Une amine*** dans laquelle le doublet libre de l'atome d'azote peut fixer un proton par coordinence.

$$-\ddot{N}H_2 + H^+ \rightleftarrows -\overset{+}{N}H_3$$

Base — Acide conjugué

Il en est de même avec le groupement = NH des imino-acides.

Un acide aminé en solution peut donc se présenter sous trois formes ionisées à partir de la forme neutre :



L'étude des spectres d'absorption a montré qu'en solution aqueuse pure, un acide aminé est essentiellement sous forme d'ion mixte dipolaire, le rapport à la forme non ionisée étant de l'ordre de 10^5. Dans les autres conditions, la proportion des trois formes ionisées dépend du pH de la solution.

3. CAS D'UN AMINO-ACIDE SIMPLE
(mono-aminé, mono-carboxylique).

Ex. : *la glycine* (fig. 4.3). En milieu fortement acide, pH = 1 par exemple, l'acide aminé est presque totalement sous la forme de cation A^+. Si par addition d'une base on élève graduellement le pH, le cation va céder successivement deux protons pour passer sous forme d'ion mixte $A^{\pm}$ puis sous forme d'anion A^- pour les pH élevés (11-12) :

Première dissociation, entre pH ~ 1 et pH ~ 6 :

$$\underset{A^+}{CH_2\begin{matrix} NH_3^+ \\ COOH \end{matrix}} \overset{K_1}{\rightleftarrows} \underset{A^{\pm}}{CH_2\begin{matrix} NH_3^+ \\ COO^- \end{matrix}} + H^+$$

Le pH correspondant exactement au milieu de la zone isoélectrique,

$$pH = \frac{pK_1 + pK_2}{2}$$

est appelé **pH *isoélectrique ou* pH *iso-ionique*** et symbolisé pH_i ou pI. Sa valeur pour la glycine est de :

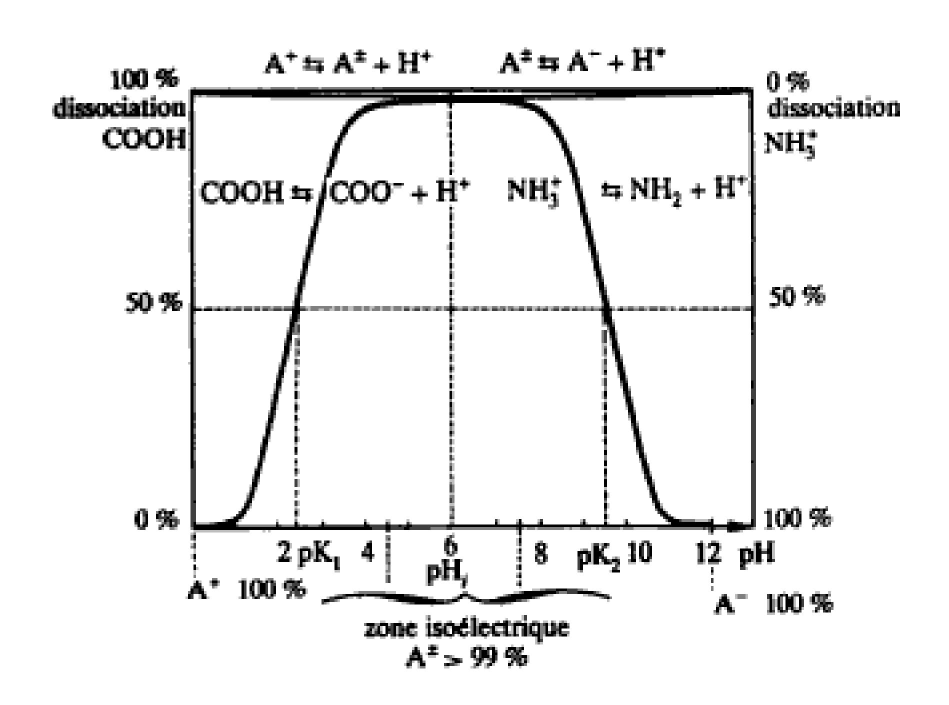
$$\frac{1}{2}\,(2{,}5 + 9{,}5) = 6\,.$$

Deuxième dissociation, entre pH ~ 6 et pH ~ 12 :

$$\underset{A^{\pm}}{CH_2\begin{matrix} NH_3^+ \\ COO^- \end{matrix}} \overset{K_2}{\rightleftarrows} \underset{A^-}{CH_2\begin{matrix} NH_2 \\ COO^- \end{matrix}} + H^+$$

Pour la glycine les valeurs des pK sont respectivement : $pK_1 = 2{,}5$ et $pK_2 = 9{,}5$. On constate de suite que la fonction acide est plus forte que l'acide acétique pour lequel pK = 4,8 (influence du groupement α-aminé) et que la fonction amine a une basicité nette. De plus, dans toute une étendue de l'échelle des pH, plus précisément de $pK_1 + 2 = 4{,}5$ où la fonction acide est pour 99 % sous forme COO^- et 1 % sous forme COOH à $pK_2 - 2 = 7{,}5$ où c'est l'inverse pour la fonction amine

$\left(NH_3^+ \ 99\ \% - NH_2\ 1\ \%\right)$, l'amino-acide est pour 99 % au moins à l'état d'ion mixte. Ce résultat, en accord avec les études spectrales, met en évidence une ***zone dite isoélectrique*** où l'acide aminé est essentiellement sous la forme $A^{\pm}$ électriquement neutre.



Placé dans un champ électrique, cet acide aminé en solution migrera vers la cathode en milieu acide, vers l'anode en milieu alcalin et ne se déplacera pas dans la zone isoélectrique, en particulier au point isoélectrique.

Tous les amino-acides qui, comme la glycine, ne possèdent que deux groupements ionisables, ont leur pH_i toujours situé entre pH = 5 et 6,5. Ils sont qualifiés d'*acides aminés neutres*.

Démonstration :

$$K_1 = \frac{(A^{\pm})\,(H^+)}{(A^+)} \qquad K_2 = \frac{(A^-)\,(H^+)}{(A^{\pm})}$$

$$K_1 \,.\, K_2 = (H^+)^2 \,.\, \frac{(A^-)}{(A^+)} \quad \text{au} \quad pH_i : (A^-) = (A^+)$$

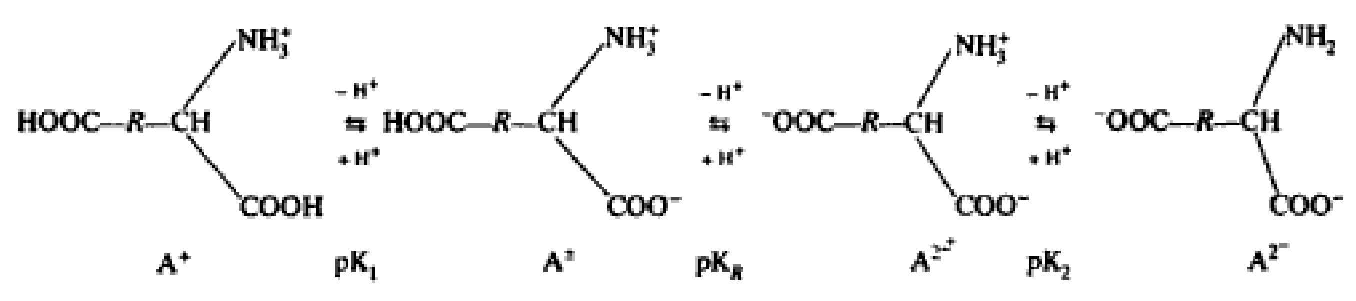
$$K_1 \,.\, K_2 = (H^+)^2 \quad \text{soit} \quad pH_i = \frac{1}{2}\left(pK_1 + pK_2\right).$$

Ex. : Les acides aminés apolaires et même polaires, les autres groupements étant très faiblement dissociés dans ces conditions.

4. CAS D'UN AMINO-ACIDE MONO-AMINÉ ET DICARBOXYLIQUE

Ex. : *L'acide glutamique.*

Il y a trois dissociations successives :



Le pH_i, correspondant au maximum d'ions mixtes $A^{\pm}$, se situe cette fois entre les deux dissociations de type acide. Sa valeur dans l'exemple choisi ($pK_1 = 2,2$ pour le COOH en α, $pK_R = 4,25$ pour le COOH en ω, $pK_2 = 9,7$) est de :

$$\frac{1}{2}(2,2 + 4,25) \# 3,2 .$$

Il s'agit donc d'un composé nettement acide d'où le terme « d'acide » glutamique. Ici il n'existe pas de *zone isoélectrique* car les deux acidités sont de forces trop voisines $\left(pK_R - pK_1 \# 2\right)$.

Démonstration :

$$K_1 = \frac{(A^{\pm})(H^+)}{(A^+)} \quad K_R = \frac{\left(A_{+}^{2-}\right)(H^+)}{(A^{\pm})} \quad K_2 = \frac{(A^{2-})(H^+)}{\left(A_{+}^{2-}\right)}$$

au pH_i : $(A^+) = \left(A_{+}^{2-}\right) + 2(A^{2-})$ soit

$$\frac{(A^{\pm})(H^+)}{K_1} = \frac{K_R(A^{\pm})}{(H^+)} + \frac{2\left(A_{+}^{2-}\right)K_2}{(H^+)}$$

$$\frac{(A^{\pm})(H^+)}{K_1} = K_R\frac{(A^{\pm})}{(H^+)} + 2(A^{\pm})\ \frac{K_R \cdot K_2}{(H^+)^2}$$

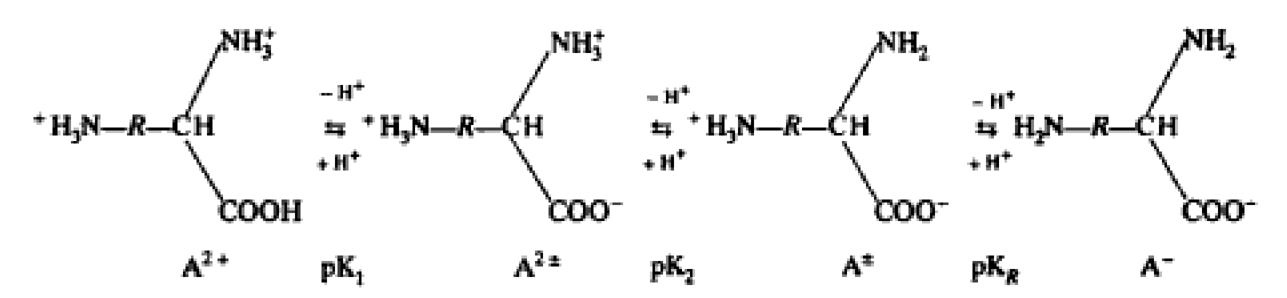
$\dfrac{(H^+)}{K_1} = \dfrac{K_R}{(H^+)}\left(1 + \dfrac{2\,K_2}{(H^+)}\right)$ le terme $\dfrac{2\,K_2}{(H^+)}$ est négligeable devant 1 au pH_i $\left[K_2 = 10^{-9,7},\ (H^+) = 10^{-3,2}\right]$

$$\frac{(H^+)}{K_1} = \frac{K_R}{(H^+)}\,; \qquad (H^+)^2 = K_R \cdot K_1$$

$$pH_i = \frac{1}{2}\left(pK_R + pK_1\right).$$

5. CAS D'UN AMINO-ACIDE BASIQUE

Ex. : La *lysine* qui possède deux fonctions amine (en α et en ε). D'où les trois dissociations :



Le pH_i se situe, cette fois, à mi-chemin entre les deux dissociations basiques, il est nettement alcalin $\left(pH_i = 9{,}75\right)$.

Pour les trois « bases hexoniques », le caractère basique décroît de l'arginine (pH_i = 10,8, groupement guanidine) à la lysine (pH_i = 9,75, fonction amine) puis à l'histidine (pH_i = 7,6, noyau imidazole).

Démonstration :

$$K_1 = \frac{\left(A^{\overset{2+}{-}}\right)(H^+)}{(A^{2+})} \qquad K_2 = \frac{(A^{\pm})(H^+)}{\left(A^{\overset{2+}{-}}\right)} \qquad K_R = \frac{(A^-)(H^+)}{\left(A^{\overset{+}{-}}\right)}$$

au pH_i $\quad 2\left(A^{2+}\right) + \left(A^{\overset{2+}{-}}\right) = \left(A^-\right)$

$$\frac{2(H^+)\left(A^{\overset{2+}{-}}\right)}{K_1} + \frac{(A^{\pm})(H^+)}{K_2} = \frac{(A^{\pm})(K_R)}{(H^+)}$$

$$\frac{2(H^+)^2(A^{\pm})}{K_1K_2} + \frac{(A^{\pm})(H^+)}{K_2} = \frac{(A^{\pm})K_R}{(H^+)}$$

$$\frac{2(H^+)^2}{K_1K_2} + \frac{(H^+)}{K_2} = \frac{K_R}{(H^+)} \qquad \frac{(H^+)}{K_2}\left[1 + 2\frac{(H^+)}{K_1}\right] = \frac{K_R}{(H^+)}$$

au pH_i le terme $2\left(\frac{H^+}{K_1}\right)$ est négligeable devant 1 $\left[\begin{array}{r}(H^+) = 10^{-9,75} \\ K_1 = 10^{-2,18}\end{array}\right]$

$$\frac{(H^+)}{K_2} = \frac{H_R}{(H^+)} ; \qquad (H^+)^2 = K_2 K_R$$

$$pH_i = \frac{1}{2}\left(pK_2 + pK_R\right) .$$

6. IMPORTANCE DE L'IONISATION

— Les acides aminés sont des *ampholytes* qui, selon le pH de leur solution par rapport à leur pH_i, se comporteront comme des acides (donneurs de protons) ou des bases (accepteurs de protons) faibles. Pour un amino-acide donné, le milieu est acide, neutre ou alcalin selon que le pH est inférieur, égal ou supérieur à son pH_i. Ce dernier correspond sensiblement au pH de la solution aqueuse pure de l'acide aminé.

— Dans une solution de pH donné, égal à 6 par exemple, les molécules d'un acide aminé neutre comme la glycine sont sous la forme $A^{\pm}$, électriquement neutre ; celles d'un amino-acide, comme l'acide glutamique sous la forme $\overset{+}{A}{}^{2-}$ (charge − 1) et celles enfin d'un amino-acide basique comme la lysine sous la forme $\overset{2+}{A}{}^{-}$ (charge + 1). Ces composés peuvent donc être séparés par les méthodes de fractionement basées sur l'existence de ces charges (électrophorèse ou chromatographie d'échange d'ions).

— *Pour titrer un acide aminé* il est possible de chercher à doser soit le carboxyle, soit la fonction amine par alcali-acidimétrie selon les équations :

$$R{-}CH(NH_3^+)(COO^-) + H^+Cl^- \rightarrow R{-}CH(NH_3^+Cl^-)(COOH) \quad [3] \quad \text{ou} \quad R{-}CH(NH_3^+)(COO^-) + Na^+OH^- \rightarrow R{-}CH(NH_2)(COO^-Na^+) + H_2O \quad [4]$$

Les variations du pH de la solution en fonction des quantités d'acide ou de base versées peuvent être mesurées par potentiométrie (fig. 4.4).

L'examen de la courbe de titration permet de retrouver les caractéristiques de la dissociation et de constater qu'il n'est pas possible de titrer correctement la plupart des amino-acides en milieu aqueux. Les *points équivalents* correspondent à des pH extrêmes et les *zones de virage sont peu nettes* (à l'exception des acides aminés dicarboxyliques ou fortement basiques). Pour conduire à bien un tel dosage, il est nécessaire de modifier les propriétés ionisantes du milieu de manière à changer des dissociations. Ce résultat est obtenu soit par addition d'un large excès de solvant organique (éthanol, acétone), soit en opérant en milieu non aqueux (milieu acétique).

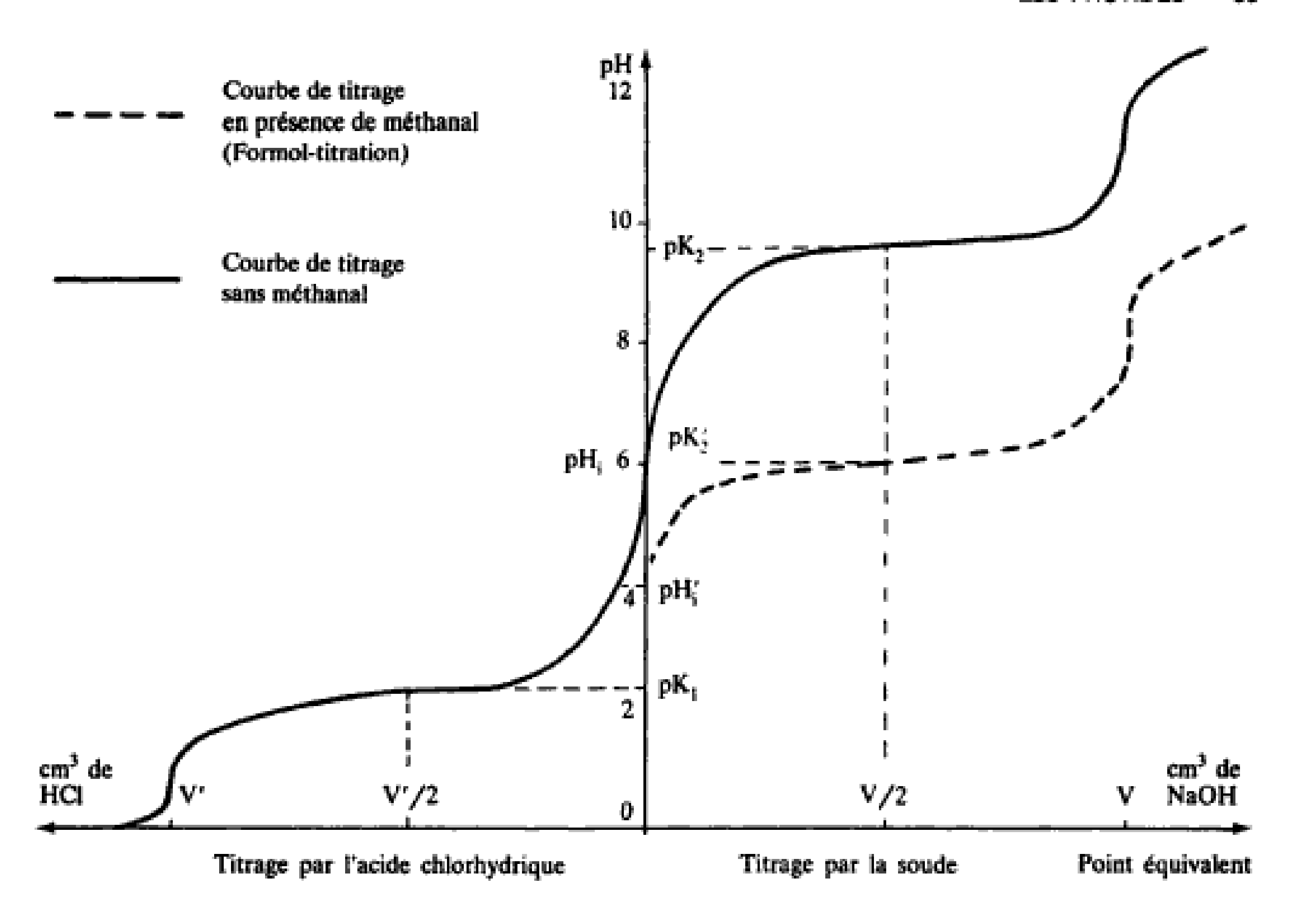


Figure 4.4 Courbe de titrage de la glycine.

La courbe de titrage de la figure 4.4 montre que, sans méthanal, les pH aux points équivalents ont des valeurs extrêmes, se situant en dehors de la zone d'utilisation de l'électrode de verre en pH-métrie.

En revanche, la formol-titration, en abaissant le pH au point équivalent permet le dosage des acides aminés neutres par la soude.

Le méthanal en excès se fixe sur la fonction $—NH_3^+$ de l'ion mixte.

$$\text{COO}^- - \text{CH}_2 - \overset{+}{\text{N}}\text{H}_3 + 2\ \text{H}_2\text{C}{=}\text{O} \rightarrow \text{COO}^- - \text{CH}_2 - {}^+\text{N}(\text{H})(\text{CH}_2\text{OH})_2$$

dérivé N dihydroxyméthylé
de la glycine

Le caractère acide de la fonction *N* dihydroxyméthylée est très fortement augmenté, puisque son pK'_2 est égal à 6,2 ; ce qui a pour conséquence d'abaisser le *pH$'_i$* du *N* dihydroxyméthyl glycine à la valeur 4,3 et d'amener le point équivalent basique à un pH de l'ordre de 8, parfaitement détectable en pH-métrie.

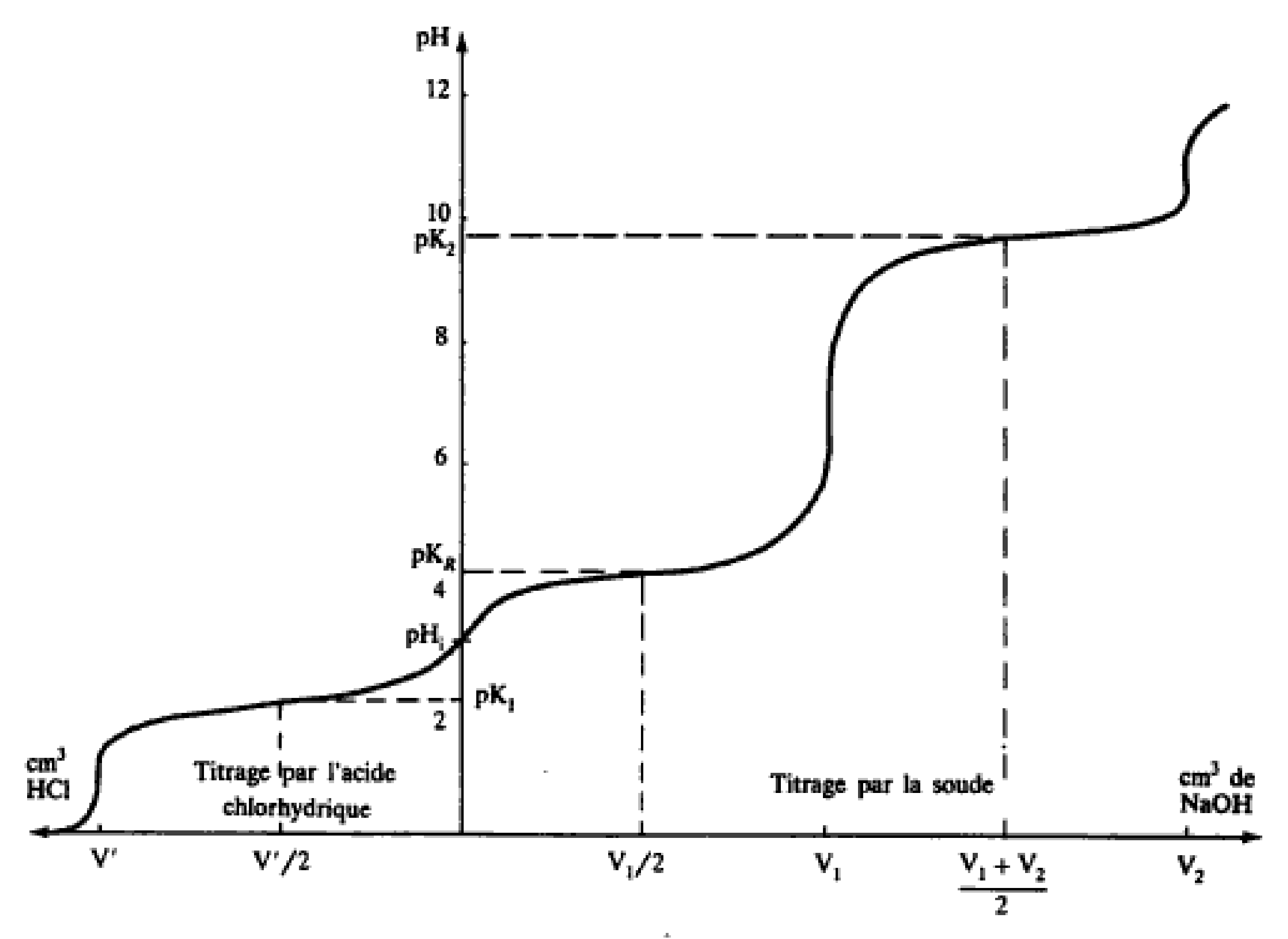


Figure 4.5 Courbe de titrage de l'acide glutamique.

La neutralisation de la fonction —COOH portée par la chaîne latérale, par la soude est le seul point équivalent $\left(V_1\right)$ aisément détectable en pH-métrie.

— En milieu franchement acide ou alcalin les *acides aminés sont salifiés* par l'une de leurs fonctions. Les sels alcalins (*Ex.* : glycocollate de sodium) sont en général bien solubles et les mélanges acide aminé, soude constituent d'excellents tampons utilisés en biochimie. Les sels acides, qui sont également à la base de tampons, sont parfois peu solubles et facilement cristallisables.

Ex. : Chlorhydrate d'acide glutamique ou sels d'acides complexes : phosphotungstates, etc.

— *Avec les cations bivalents,* les acides aminés forment des *complexes chélatés* plus ou moins stables. Chaque molécule d'amino-acide est liée au cation, d'une part grâce à son carboxyle par une liaison ionique, d'autre part au moyen de son groupement α aminé par une coordinence. La molécule chélate l'ion (chélate signifie en forme de pince de crabe) et le masque à ses réactifs.

Ex. : Si l'on ajoute une solution d'un sel cuivrique à une solution neutre d'amino-acide, il apparaît une coloration bleue intense et l'ion Cu^{2+} est masqué par

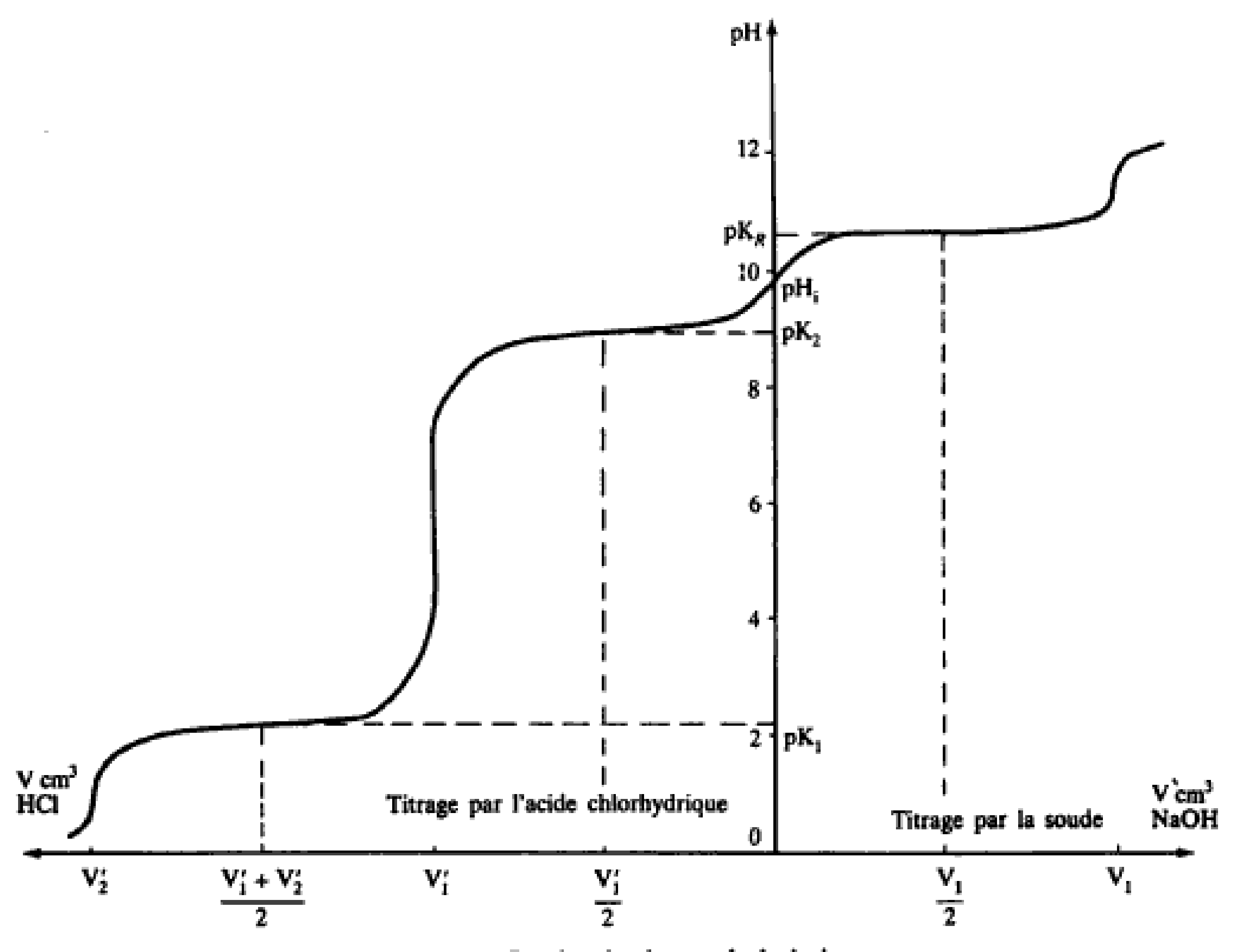


Figure 4.6 Courbe de titrage de la lysine.

La neutralisation de la fonction αNH_2 par l'acide chlorhydrique est le seul point équivalent (V'_1) aisément détectable en pH-métrie.

formation d'un complexe du type :

Cette propriété dérivant du voisinage des deux fonctions a reçu des applications analytiques.

B. Décarboxylation, désamination

La perte de chacune des fonctions caractéristiques peut avoir lieu séparément ou simultanément.

1. DÉCARBOXYLATION

Les acides aminés sont décarboxylés pour former des amines primaires selon l'équation :

$$R{-}CH(NH_2){-}COOH \rightarrow R{-}CH_2{-}NH_2 + CO_2$$

Cette réaction se réalise par chauffage dans un solvant inerte ou sous l'action d'enzymes tissulaires et bactériennes (bactéries des fermentations putrides) : les *décarboxylases*. La spécificité d'action de ces enzymes est généralement grande : décarboxylation d'un seul amino-acide et plus particulièrement d'un stéréo-isomère, généralement *L*.

— *In vitro* ces enzymes sont utilisées pour identifier et doser de façon spécifique un amino-acide au sein d'un mélange (méthode gazométrique).

— *In vivo*, l'importance de ces réactions tient aux propriétés des amines ainsi formées.

Certaines de ces amines sont douées d'activité physiologique ou pharmacodynamique : histamine provenant de l'histidine, tyramine de la tyrosine.

D'autres sont toxiques, encore que certaines aient été caractérisées à l'intérieur d'inclusions cytoplasmiques (ribosomes) : cadavérine dérivée de la lysine, putrescéine de l'ornithine.

Enfin beaucoup interviennent dans les synthèses biochimiques : éthanolamine résultant de la décarboxylation de la sérine, β-mercapto-éthylamine ou thioéthanolamine dérivant de la cystéine.

2. DÉSAMINATION

La perte de la fonction amine peut être d'origine :

— *chimique*. Sous l'action de l'acide nitreux il y a formation d'un dérivé diazoïque instable qui se décompose avec libération d'azote et formation d'un acide-alcool.

$$R{-}CH(NH_2){-}COOH + HNO_2 \rightarrow \left[R{-}CH(N{=}N{-}OH){-}COOH \right] + H_2O$$
$$\left[R{-}CH(N{=}N{-}OH){-}COOH \right] \rightarrow R{-}CHOH{-}COOH + N_2$$

Cette réaction permet le dosage gazométrique de l'azote aminé selon la méthode de Van Slyke ;

— *enzymatique*. Deux types de mécanismes sont alors possibles.

La désamination généralement couplée à une oxydation (désamination oxydative). C'est un processus de dégradation conduisant à l'ammoniac et à un acide

α-cétonique selon l'équation schématique :

$$R\text{—}CH(NH_2)(COOH) + 1/2\ O_2 \rightarrow R\text{—}CO\text{—}COOH + NH_3$$

Ex. :

$$\textit{Alanine} + 1/2\ O_2 \rightarrow \textit{acide pyruvique} + NH_3\ .$$

En fait, l'oxydation ne fait pas intervenir directement l'oxygène mais une déshydrogénation suivie d'une hydrolyse.

$$R\text{—}CH(NH_2)(COOH) \xrightarrow{-2H} R\text{—}C(=NH)(COOH) \xrightarrow{+H_2O} R\text{—}CO\text{—}COOH + NH_3$$

Imino-acide

Les enzymes sont des amino-acides oxydases spécifiques des formes *D* ou *L* et parfois de l'amino-acide.

L'enzyme qui joue un rôle fondamental chez de nombreux organismes est la glutamate déshydrogénase qui catalyse la réaction suivante :

$$\text{acide } L\text{-glutamique} + H_2O + NAD^+ \underset{2}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} \text{acide } \alpha\text{-cétoglutarique} + NADH, H^+ + NH_3\ .$$

Dans le sens 1, elle catalyse la désamination oxydative du glutamate ; dans le sens 2, elle catalyse l'amination réductrice de l'α-cétoglutarate.

Chez certains organismes la glutamate déshydrogénase est une enzyme à $NADP^+$.

Les amino-acides oxydases sont des flavoprotéines autooxydables, dont la distribution est non universelle et d'importance secondaire.

La *L*-amino-acide oxydase est une enzyme à *FMN* et est spécifique des acides aminés de la série *L*.

La *D*-amino-acide oxydase est une enzyme à *FAD* et est spécifique des acides aminés de la série *D*.

La transamination ou transfert direct du groupement aminé à un acide α-cétonique sous l'influence des transaminases ou amino-transférases.

Ex. :

Alanine + acide α-cétoglutarique ⇄ acide glutamique + acide pyruvique

Transaminase glutamique-pyruvique ou ALAT (*)

$$CH_3\text{—}CH(NH_2)(COOH) + HOOC\text{—}(CH_2)_2\text{—}CO\text{—}COOH \rightleftharpoons HOOC\text{—}(CH_2)_2\text{—}CH(NH_2)(COOH) + CH_3\text{—}CO\text{—}COOH$$

(*) ALAT = alanine amino-transférase.

Ces réactions de transamination interviennent à la fois dans les synthèses et les dégradations des acides aminés naturels.

Chez les animaux, le couple de molécules : acide glutamique et acide α-cétoglutarique joue le rôle central dans le mécanisme de désamination des acides aminés.

L'acide α-cétoglutarique collecte le groupement aminé de la plupart des amino-acides, l'acide glutamique qui en résulte est désaminé par la *L*-glutamate déshydrogénase.

acide aminé $R{-}CH(NH_2){-}COOH$ → $R{-}CO{-}COOH$ acide α-cétonique

Transaminase

acide α-cétoglutamique $COOH{-}CH_2{-}CH_2{-}CO{-}COOH$ ⇄ $COOH{-}CH_2{-}CH_2{-}CH(NH_2){-}COOH$ acide glutamique

NH_3, H_2O

L-glutamate déshydrogénase

$NADH, H^+$ ← NAD^+

3. DÉSAMINATION ET DÉCARBOXYLATION SIMULTANÉES

Sous l'influence d'*oxydants doux* comme l'eau oxygénée, les hypochlorites à chaud, les dérivés renfermant plusieurs carbonyles dans un cycle, l'acide aminé est décarboxylé et désaminé.

$$R{-}CH(NH_2){-}COOH + \underline{O} \rightarrow R{-}CHO + NH_3 + CO_2$$

Aldéhyde (n − 1) C

Parmi les composés permettant cette réaction, le plus utilisé est la *ninhydrine* ou hydrate de tricétohydrindène.

Dans un premier temps, la réaction aboutit à la formation de ninhydrine réduite ou hydrindantine.

$$\varphi(CO)_2C(OH)_2 + R{-}CH(NH_2){-}COOH \rightarrow R{-}CHO + NH_3 + CO_2 + \varphi(CO)_2C(H)(OH)$$

Puis l'ammoniac formé, la ninhydrine réduite et un excès de ninhydrine réagissent pour former un composé qui, sous forme énolique, est ionisé à pH = 5,5 et

coloré en bleu violet intense.

$$\varphi\begin{matrix}-CO\\-CO\end{matrix}>C<\begin{matrix}H\\OH\end{matrix} + NH_3 + \begin{matrix}HO\\HO\end{matrix}>C<\begin{matrix}CO-\\CO-\end{matrix}\varphi \rightarrow \varphi\begin{matrix}-CO\\-C(O^-H^+)\end{matrix}>C-N=C<\begin{matrix}CO-\\CO-\end{matrix}\varphi + 3\,H_2O$$

Pigment (forme énolique)

Cette réaction offre de multiples possibilités analytiques : qualitativement, elle permet une révélation aspécifique des acides aminés ; seules la proline et l'hydroxyproline fournissent une coloration différente, orangée. Par contre l'identification de l'aldéhyde formé conduit à celle de l'amino-acide. Quantitativement, tous les produits de la réaction peuvent être dosés, en particulier l'intensité de la coloration obtenue permet un microdosage colorimétrique des amino-acides bien que cette intensité varie légèrement selon la nature de l'acide aminé.

C. Formation de dérivés des fonctions carboxyliques et aminées

1. AMIDIFICATION

— Le carboxyle comme l'amine peuvent être *amidifiés individuellement.* Certains composés naturels répondent à cette structure.

Ex. :

L'asparagine et la glutamine sont des amides

L'acide hippurique, qui représente la forme d'élimination de l'acide benzoïque, est un amide substitué :

$$\underbrace{C_6H_5CO}_{\text{Acide benzoïque}}-\underbrace{NH-CH_2-COOH}_{\text{Glycine}}$$

L'acide pantothénique, facteur vitaminique du groupe B, correspond à l'amidification de la β-alanine par l'acide dihydroxydiméthylbutyrique :

$$HOOC-CH_2-CH_2-NH-OC-CHOH-\underset{CH_3}{\overset{CH_3}{\underset{|}{\overset{|}{C}}}}-CH_2OH$$

— *La liaison amide substituée* —CO—NH— peut s'établir entre deux amino-acides par l'intermédiaire du carboxyle de l'un et du groupement α-aminé de l'autre. Elle est alors appelée *liaison peptidique* et le produit obtenu *peptide,* plus

précisément dipeptide :

$$\underbrace{H_2N-\underset{\displaystyle R_1}{\underset{|}{CH}}-}_{\text{Résidu d'amino-acide}}\underbrace{CO-NH}_{\text{Liaison peptidique}}-\underset{\displaystyle R_2}{\underset{|}{CH}}-COOH$$

Cette liaison peptidique correspond au mode d'enchaînement des acides aminés dans les protides complexes (peptides et protéines). Si elle s'établit avec un carboxyle ou une fonction amine situés dans une autre position (β, ε, ω), la liaison est dite alors peptidoïde. Dans tous les cas, une hydrolyse chimique ou enzymatique permet de libérer les acides aminés constitutifs.

La formation d'une liaison peptidique à partir de deux amino-acides n'est pas spontanée, elle nécessite de l'énergie, c'est-à-dire une activition, au moins de l'un des groupements.

• La synthèse chimique ne nécessite généralement que l'*activation* d'une seule fonction. Pour des raisons pratiques, on choisit l'activation du groupement carboxylique à condenser ; le groupement activateur étant éliminé au cours de la réaction de condensation.

Lors de l'activation comme lors de la condensation, il est indispensable de protéger les groupements qui ne doivent pas réagir. En particulier, avec certains dérivés ; le chauffage conduit à une amidification des deux groupements de chaque acide aminé aboutissant à un composé cyclique qui ne peut plus réagir, une *dicétopipérazine :*

$$R_1-CH\begin{matrix} \diagup CO-NH \diagdown \\ \diagdown NH-OC \diagup \end{matrix}CH-R_2$$

Dicétopipérazine ou dipeptide cyclique

L'agent protecteur doit être facile à fixer, ne pas perturber la synthèse peptidique et être facilement éliminé à l'issue de la réaction de condensation.

Cette *protection* peut concerner, soit les fonctions amine et carboxyle terminales, soit des fonctions portées par les chaînes latérales (amine, carboxyle, thiol, guanidine, etc.).

En respectant ces précautions il est actuellement possible d'enchaîner dans un ordre déterminé un nombre important d'acides aminés et de réaliser ainsi la synthèse de peptides et de protéines (p. 81).

• La synthèse biochimique, qui est un phénomène essentiel du métabolisme cellulaire, nécessite non seulement des facteurs d'apport (amino-acides, ions minéraux, composés énergétiques) mais aussi des facteurs réactionnels (enzymes, acides nucléiques, constituants cellulaires).

— *La structure de la liaison peptidique.* Cette liaison possède quatre électrons π, deux pour la liaison C═O et deux représentant le doublet libre de l'atome d'azote. Il s'établit un hybride de résonance et la liaison C—N, de type σ, est partiellement doublée par une liaison π (fig. 4.7), le taux de double liaison étant d'environ 30 %

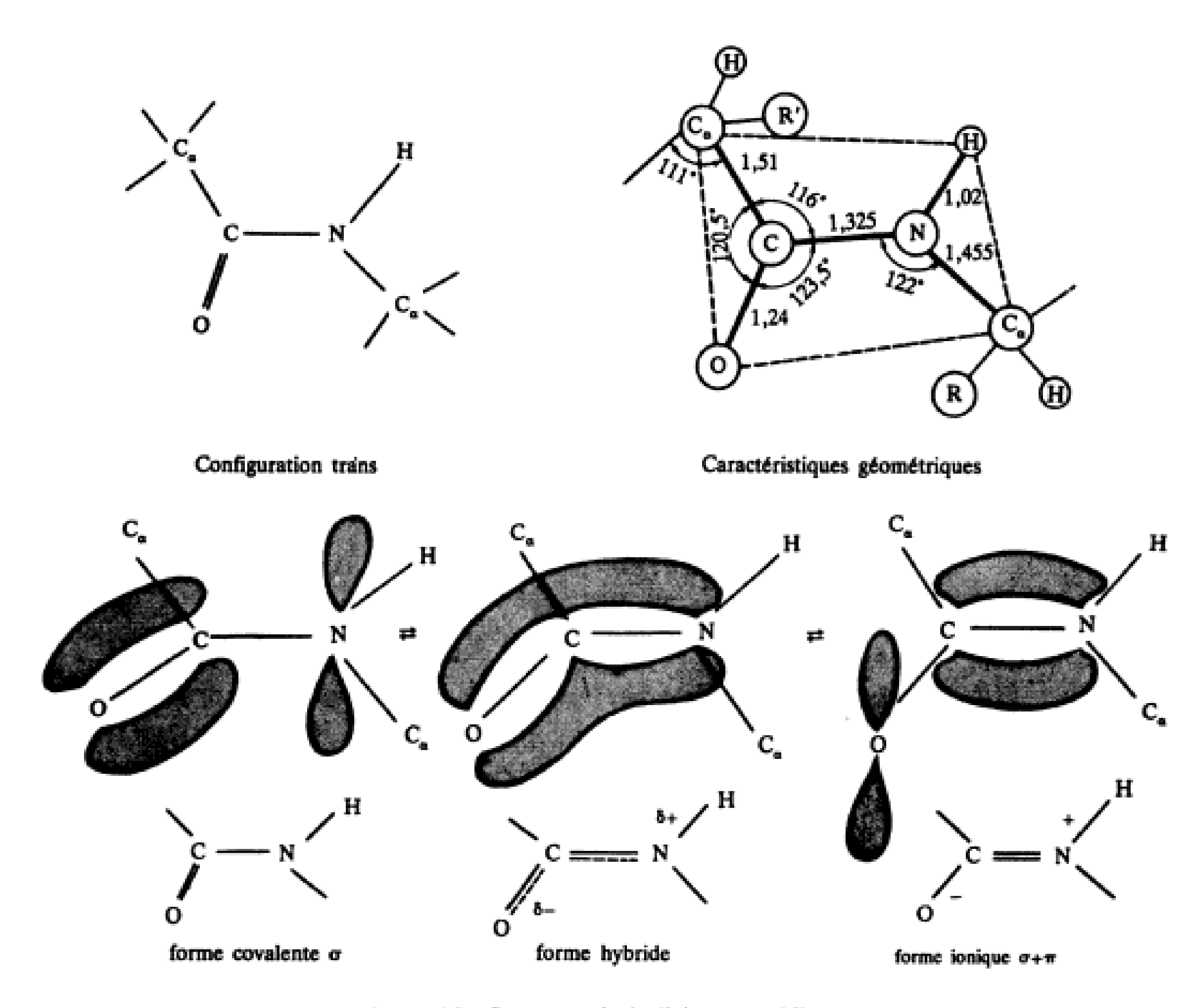


Figure 4.7 Structure de la liaison peptidique.

pour le C—N et 70 % pour le CO. Il en découle plusieurs conséquences importantes pour la structure des peptides et des protéines.

• La liaison peptidique est stabilisée par résonance (énergie de l'ordre de 20 kcal/mol, soit 84 kJ/mol).

• Les divers atomes de la liaison (C, O, H et N) sont coplanaires, la libre rotation autour de la liaison C—N n'est pas possible sans apport énergétique. La configuration trans, dans laquelle les forces de répulsion entre les deux atomes de carbone sont réduites, est donc ainsi stabilisée.

• Les distances inter-atomiques C—N et C—O correspondent à ce caractère hybride.

• La liaison peptidique acquiert un caractère ionique partiel qui accroît la mobilité de l'atome d'hydrogène.

La géométrie de cette liaison peptidique a d'ailleurs été confirmée par des mesures radio-cristallographiques.

2. AUTRES DÉRIVÉS

Nous envisagerons seulement quelques exemples.

— Certains *produits naturels* sont des dérivés de substitution de la fonction amine.

Ex. : La sarcosine est un dérivé monométhylé de la glycine et la glycine bétaïne un dérivé triméthylé :

$$\underset{\text{Glycine}}{CH_2(NH_3^+)(COO^-)} \qquad \underset{\text{Sarcosine}}{CH_2(NH_2^+{-}CH_3)(COO^-)} \qquad \underset{\text{Glycine bétaïne}}{CH_2(N^+(CH_3)_3)(COO^-)}$$

— La formation du dérivé *peut permettre d'identifier* l'acide aminé auquel appartient le groupement libre. La méthode consiste à faire agir sur un composé peptidique un réactif des groupements aminés ou carboxyliques libres. L'acide aminé combiné au réactif est isolé, après hydrolyse, et le dérivé obtenu identifié par ses caractéristiques physiques.

Ex. : Le groupement aminé peut se condenser avec divers dérivés aromatiques, comme le 1-fluoro, 2-4-dinitrobenzène (DNFB) à la température ambiante et en milieu légèrement alcalin :

$$O_2N{-}\varphi(NO_2){-}F + (H_2N)(HOOC)CH{-}R \rightarrow O_2N{-}\varphi(NO_2){-}NH{-}CH(R)(HOOC) + HF$$

α-dinitrophénylamino-acide

Le produit obtenu, généralement coloré en jaune, est décomposé en milieu fortement alcalin mais résiste assez bien à l'hydrolyse acide. Il possède un spectre d'absorption caractéristique dans le bleu et l'ultraviolet. En fait, le DNFB réagit avec tous les groupements aminés libres et les acides diaminés conduisent à plusieurs dérivés dinitrophénylés séparables par chromatographie.

— Le dérivé obtenu n'a plus les mêmes propriétés que le *groupement initial* qui est ainsi *inhibé, protégé ou activé.*

Ex. : A la température ambiante et en milieu neutre le formol en large excès réagit sur la fonction amine pour former des dérivés hydroxyméthylés :

$$R{-}CH(COOH){-}N^{+}H(CH_2OH)_2$$

Dérivé N-dihydroxyméthylé

L'ion ammonium trisubstitué formé par ionisation permet un dosage par une base forte.

Cette technique a reçu le nom de *formoltitration de* Sörensen.

L'influence du formol sur la courbe de titration est représentée pour la glycine figure 4.4.

— D'autres dérivés, esters, anhydrides, etc., sont utilisés dans les synthèses peptidiques (p. 81).

D. Propriétés des chaînes latérales

— Les chaînes latérales accroissent les possibilités réactionnelles des amino-acides.

— ***Les hydroxyles alcooliques*** peuvent être *estérifiés* (esters acétiques, phosphoriques). En position β, comme dans la sérine et la thréonine, ils sont *oxydés* par le periodate en milieu légèrement alcalin :

$$R{-}CHOH{-}CH(NH_2){-}COOH + IO_4^- \rightarrow R{-}CHO + \underset{\text{Acide glyoxylique}}{CHO{-}COOH} + NH_3 + IO_3^-$$

Cette réaction possède de nombreuses applications analytiques par suite des composés formés.

— ***La présence d'un noyau aromatique*** modifie, non seulement les propriétés optiques (p. 54), mais rend possible des *réactions de substitution*. ***Ex.*** : Les dérivés iodés de la tyrosine sont des constituants des hormones thyroïdiennes ; les dérivés nitrés aromatiques, colorés en jaune, participent à la réaction xanthoprotéique.

— ***Les groupements thiols*** se combinent avec les cations lourds et forment des thioesters $R{-}CO{-}SR$ très actifs. Leur *dégradation par oxydation* conduit à un acide sulfonique $R{-}SO_3H$. ***Ex.*** : l'acide cystéique

$$HO_3S{-}CH_2{-}CH(NH_2){-}COOH$$

et son produit de décarboxylation la taurine

$$HO_3S—CH_2—CH_2—NH_2$$

Enfin ces chaînes latérales donnent lieu à des *réactions colorées*, plus ou moins spécifiques, qui sont utilisées pour l'identification des amino-acides après chromatographie et parfois pour leur dosage.

V. PRÉPARATION ET ANALYSE DES ACIDES AMINÉS

A. Préparation

Actuellement un acide aminé pur est préparé à partir d'un produit naturel (protéine) lorsqu'il est à la fois abondant et facile à isoler ou synthétisé par voie chimique ou microbiologique. De nombreux travaux de nutrition ou d'enzymologie nécessitent l'obtention d'un isomère actif, *D* ou *L*, pur. La plupart des opérations chimiques aboutissant à un composé racémique, il est donc nécessaire, par des opérations dites « de résolution » du racémique, d'isoler l'une des formes actives. En outre, au cours de la synthèse, il est *possible de marquer l'acide aminé* en incluant dans sa molécule un isotope $\left({}^{2}_{1}H, {}^{14}_{6}C, {}^{13}_{6}C, {}^{18}_{8}O, {}^{15}_{7}N, \ldots\right)$ à une place déterminée ; ce qui permet ensuite de le suivre au cours des transformations biochimiques.

B. Fractionnement des mélanges d'amino-acides

La séparation des acides aminés ou de leurs dérivés a constitué l'un des problèmes analytiques les plus difficiles. Les méthodes classiques de précipitation et cristallisation fractionnées, d'extraction par solvants sélectifs, n'offrent que des possibilités très limitées. Le problème est maintenant résolu grâce à deux groupes de techniques : l'électrophorèse et la chromatographie qui peuvent d'ailleurs être associées.

L'**électrophorèse,** ou ionophorèse dans ce cas, effectuée dans une cuve à compartiments et sur support (papier, acétate de cellulose, gels) permet surtout, compte tenu de la dissociation, une séparation en groupes : acides aminés neutres, acides, basiques.

La **chromatographie** offre plus de possibilités :

— chromatographie par échanges d'ions avec élution isocratique ;

— chromatographie par échanges d'ions avec élution par gradient de pH discontinu ;

— chromatographie par échanges d'ions avec élution par gradient de pH continu (méthode de Moore et Stein et méthodes dérivées) ;

(Dans ce dernier cas, le fractionnement peut être suivi d'un dosage colorimétrique ; l'ensemble des opérations automatisées permet l'analyse quantitative d'un mélange complexe d'acides aminés tels qu'un hydrolysat protéique.)

— chromatographie d'adsorption sur couche mince (gel de silice) ;

— chromatographie en phase réverse (surtout utilisée en CLHP) (*) avec élution isocratique ou par un gradient de polarité.

C. Identification et dosage des acides aminés

Les méthodes de fractionnement sont utilisables pour l'identification des amino-acides, mais elles doivent être complétées par des méthodes chimiques et biologiques qui permettent également l'estimation quantitative.

Méthodes générales. — La fonction acide aminé est identifiée par des réactions colorées. La réaction à la ninhydrine est l'un des meilleurs exemples, elle n'est pas toutefois absolument spécifique puisque les amines et dans certains cas l'ammoniac peuvent conduire à la même coloration.

Les méthodes générales de dosage sont pratiquement toutes entachées d'erreur lorsqu'on les applique à des mélanges et ne permettent alors qu'une évaluation plus ou moins arbitraire.

Ex. : Dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl, formoltitration de Sörensen, dosage de l'azote aminé selon la méthode de Van Slyke, méthode colorimétrique à la ninhydrine.

Méthodes particulières. — Elles font intervenir soit la structure chimique de la chaîne latérale, soit des réactions enzymatiques et permettent en principe d'identifier et de doser spécifiquement un acide aminé dans un mélange.

Les réactions colorées spécifiques ont perdu de leur intérêt depuis que le fractionnement complet est relativement aisé, du moins pour les dosages car elles sont encore utilisées pour la révélation des chromatogrammes.

Les méthodes spectrophotométriques dans l'ultraviolet et les dosages enzymatiques tendent à remplacer les techniques microbiologiques et isotopiques qui ne sont jamais d'un usage courant pour les amino-acides.

Les peptides

Premier groupe de protides complexes, les peptides sont des composés naturels ou synthétiques qui résultent de l'enchaînement d'un nombre limité d'acides aminés par des liaisons peptidiques. Les plus importants possèdent un nom commun, mais il existe pour tous une *nomenclature* systématique. La désignation est établie en

(*) CLHP : chromatographie liquide haute performance.

commençant par l'acide aminé dont le carboxyle est engagé et le groupement α-aminé libre, en ajoutant à la racine de son nom le suffixe yl. Puis viennent dans l'ordre, les autres résidus dont les noms sont également modifiés ; enfin le dernier, pour lequel le groupement carboxylique est libre, conserve son appellation :

Ex. : Alanyl—leucyl—tyrosyl—valine.

La nomenclature peut être simplifiée en utilisant l'abréviation classique de chaque acide aminé. La liaison peptidique est alors schématisée par un tiret ou une flèche dans le sens CO → NH, les groupements terminaux sont indiqués par $H(NH_2)$ et $OH(COOH)$, enfin les fonctions amides et les ponts disulfures sont représentés par les symboles chimiques NH_2 et S—S.

Ex. :

H—Gly—Val—Glu—Glu—Cys—Ala—Val—Cys—Ser—AlaOH

(Glu en position 4 : NH_2 ; pont S—S entre les deux Cys)

I. STRUCTURE DES PEPTIDES

La structure des peptides résulte de celle de liaison peptidique (cf. p. 71, fig. 4.7) ; cette liaison ayant un caractère partiel de double liaison, la chaîne peptidique adopte une configuration trans en zig-zag.

Résidu amino-acyl N terminal

Résidu amino-acyl C terminal

Figure 4.8 Structure d'un peptide.

Analyser la structure d'un peptide, c'est déterminer sa composition en acides aminés et établir leur séquence, c'est-à-dire leur mode d'enchaînement.

Le séquençage d'un peptide sera décrit avec l'étude de la structure primaire des protéines.

II. PROPRIÉTÉS DES PEPTIDES

A. Les propriétés physiques

Ces propriétés sont intermédiaires entre celles des amino-acides et celles des protéines. Elles dépendent à la fois de leur taille, autrement dit de leur masse molaire, et de la nature des acides aminés qui les constituent.

Ce sont des solides blancs, généralement cristallisables et plus ou moins solubles dans l'eau. Ils présentent un caractère amphotère et possèdent un point isoélectrique.

La molécule peptidique renferme des carbones asymétriques donc un pouvoir rotatoire. Elle présente dans l'ultraviolet une forte bande d'absorption entre 180 et 230 nm, caractéristique de la liaison peptidique et éventuellement une seconde bande due à la présence de résidus aromatiques, à 280 nm.

B. Les propriétés chimiques

Elles sont également liées à la composition des peptides. La seule qui soit particulièrement intéressante dérive de la liaison peptidique : mobilité de l'hydrogène et présence d'électrons libres qui rendent possible la formation de complexes.

En particulier en milieu alcalin, les liaisons peptidiques forment avec les ions cuivriques un complexe violet dans la *réaction dite du biuret.* Si, à une solution de peptide, on ajoute de la soude et une trace de sulfate de cuivre, il se développe rapidement une coloration violacée caractéristique. La réaction est franchement positive à partir des tétrapeptides (3 CONH), elle n'est pas absolument spécifique des peptides car les composés qui possèdent au moins deux groupements $CONH_2$ dans leur molécule réagissent d'une façon analogue (biuret, oxamide, malonamide), mais leur présence est exceptionnelle.

Cette réaction colorée commune aux peptides et aux protéines permet un dosage colorimétrique de ces composés.

III. EXEMPLES DE PEPTIDES

Si les amino-acides peuvent être considérés comme des monopeptides, la liaison caractéristique n'apparaît qu'avec les dipeptides. Plutôt qu'à une classification c'est à l'énumération de quelques exemples que nous limiterons notre étude.

• **La carnosine** et l'**ansérine,** qui sont des dipeptides extraits du tissu musculaire et dont le rôle biologique est encore imprécis (intervention dans les phosphorylations). Tous les deux renferment de l'alanine et de l'histidine mais, cas exceptionnels, l'alanine est sous sa forme β.

Carnosine : β-alanyl-histidine, ansérine : β-alanyl-1-méthylhistidine :

$$H_2N—CH_2—CH_2—CONH—CH(CH_2—C_3H_3N_2)—COOH$$

(CH₂ lié au C du cycle imidazole : HC=C, N, NH, CH)

Carnosine

• Le **glutathion** est un tripeptide essentiellement cellulaire de répartition très générale. Il est composé de cystéine, acide glutamique et glycine, la liaison acide glutamique → cystéine, se faisant par le carboxyle en γ :

$$\underset{H_2N}{\overset{HOOC}{>}}CH—CH_2—CH_2—\overset{\text{Liaison peptidoïde}}{CONH}—\underset{\underset{SH}{|}}{\underset{CH_2}{|}}{CH}—\overset{\text{Liaison peptidique}}{CONH}—CH_2—COOH$$

γ-glutamyl-cystéyl-glycine

Par l'intermédiaire de son groupement thiol, le glutathion symbolisé *G—SH* peut être oxydé réversiblement :

$$2\,G—SH \rightleftarrows G—S—S—G + 2\,H^+ + 2\,e^-.$$

Il s'agit là d'un véritable système d'oxydoréduction, analogue au système cystéine ⇄ cystine, mais plus actif par suite d'une meilleure solubilité et d'une plus grande mobilité de l'hydrogène du groupement thiol. Le glutathion est oxydé lentement par l'oxygène, mais aussi par le ferricyanure, le 2-6-dichlorophénolindophénol ; il est réduit par le sulfure d'hydrogène, l'hydrogène naissant ou par voie enzymatique.

• **Peptides hormonaux.** — Il s'agit, en particulier, d'hormones hypophysaires et pancréatiques. C'est la comparaison des séquences de ces peptides selon l'espèce animale et celle de leurs propriétés qui a permis d'établir les principaux résultats relatifs à la structure primaire (p. 92).

— La *vasopressine et l'ocytocine* post-hypophysaires sont des nonapeptides semi-cycliques par un pont disulfure. Leurs structures sont voisines et dans les deux cas le carboxyle terminal est amidifié. Les effets physiologiques sont différents : contractions utérines sous l'influence de l'ocytocine, augmentation de la pression

artérielle et effet antidiurétique pour la vasopressine :

```
H—Cys → Tyr            H—Cys → Tyr
  |      ↓               |      ↓
  S     Ile              S     Phe
  |      ↓               |      ↓
  S     Glu—NH2          S     Glu—NH2
  |      ↓               |      ↓
  Cys ← Asp—NH2          Cys ← Asp—NH2
  ↓                      ↓
  Pro                    Pro
  ↓                      ↓
  Leu                    Lys ou Arg
  ↓                      ↓
  Gly—NH2                Gly—NH2

  Ocytocine              Vasopressine
```

— La *corticotrophine* ou hormone adrénocorticotrope (ACTH) antéhypophysaire est un polypeptide linéaire contenant 39 résidus d'acides aminés. Cette hormone détermine l'hypertrophie de la glande surrénale.

— L'*insuline,* hormone pancréatique sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans, a un effet hypoglycémiant. C'est un polypeptide de masse molaire 6.000 qui peut former des polymères par association (12.000, 36.000, 48.000) et fait ainsi transition avec les protéines. Elle est considérée à ce titre comme la première protéine dont la structure a été entièrement déterminée. La molécule est constituée de 51 résidus d'amino-acides groupés en deux chaînes : la chaîne *A* de 21 résidus avec un pont disulfure et la chaîne *B* de 30 résidus. Les deux chaînes *A* et *B* sont réunies par des liaisons disulfures et la séquence de chacune d'elles est entièrement connue (fig. 4.9).

S—S
Chaîne *A* 21 résidus
S S
S S
Chaîne *B* 30 résidus

Figure 4.9 Structure schématique de la molécule d'insuline.

La structure primaire varie selon l'espèce animale considérée ; de plus des hydrolyses partielles ont mis en évidence la possibilité de détacher certains résidus sans perte de l'activité hypoglycémiante.

Les molécules d'insuline peuvent s'associer d'abord 2 à 2 par l'intermédiaire de cations, Zn^{2+}, par exemple, puis en unités d'ordre supérieur (3×12.000 ou 4×12.000). Il s'agit là d'un premier exemple de complication structurale.

— Le *glucagon,* autre hormone pancréatique sécrétée par les cellules α des îlots de Langerhans, est hyperglycémiant. C'est un polypeptide linéaire composé de 29 résidus.

• **Peptides antibiotiques et toxiques.** — Divers organismes (bactéries, moisissures, levures, etc.) élaborent des peptides de structures et de propriétés particulières.

Au point de vue structural il faut noter les caractéristiques suivantes :

— Beaucoup de ces peptides sont cycliques ou semi-cycliques.

— Ils renferment des acides aminés rares ou de la série *D* qui sont parfois associés à d'autres composés.

— Enfin certains peptides sont constitués par la polymérisation d'un seul amino-acide.

Au point de vue effet, les uns sont de véritables toxines, d'autres sont des antibiotiques, ils inhibent la croissance et la multiplication de micro-organismes (pouvoir bactériostatique) ou les détruisent (pouvoir bactéricide).

Ex. :

— La *phalloïdine,* extraite de l'Amanite phalloïde est un peptide cyclique comprenant sept résidus dont certains correspondent à des acides aminés rares. Ce peptide est très toxique, 50 µg tuent une souris. Les *amanitines* extraites de la même espèce sont également des peptides.

— Les *acides poly-D-glutamiques,* produits de polycondensation de l'acide *D*-glutamique, dont la masse molaire peut atteindre 100.000 se rencontrent chez les bactéries du genre *Bacillus,* en particulier dans les capsules de *Bacillus anthracis.*

— Les *peptides à activité antibiotique* sont nombreux et classés selon leur origine en différents groupes. Les gramicidines, tyrocidines, bacitracines, polymyxines sont des cyclopeptides.

L Orn → L Leu
L Val D Phé
L Tyr L Pro
L Glu L Phé
L Asp ← D Phé

Tyrocidine A *(Bacillus Brevis)*
Cyclo-décapeptique

Les actinomycines sont des hétéropeptides car, en plus de la fraction peptidique, elles renferment un groupe chromophore rouge non peptidique et font transition avec d'autres antibiotiques, du type pénicilline par exemple :

Fraction peptidique commune
φ
Cystéine S CH_3 Valine
CH_2—CO—NH—CH—CH C—CH_3
chaîne latérale OC—N———CH—COOH
Pénicilline G

• **Peptides inhibiteurs.** — Un certain nombre de peptides sont libérés lors de l'activation d'enzymes. Ainsi le trypsinogène pancréatique est activé en trypsine au contact de celle-ci ou de l'entérokinase selon le schéma :

Trypsinogène inactif → *trypsine active* + *hexapeptide*
↑
Entérokinase
ou trypsine .

Il en est de même de l'activation du pepsinogène et du chymotrypsinogène, seules les fractions libérées sont différentes. On peut également rapprocher de ces exemples la transformation du fibrinogène en fibrine sous l'action de la thrombase avec libération de fragments peptidiques. Il s'agit dans tous ces cas de protéolyses partielles.

• **Divers.** — Des structures peptidiques se retrouvent dans certains composés qui ne sont pas toutefois de véritables peptides.

Ex. :Alcaloïdes de l'ergot du seigle *(Claviceps purpurea)* ; acide pantothénique (facteur vitaminique du groupe *B*), etc.

• L'aspartam est un dipeptide de synthèse, ayant un pouvoir sucrant important, utilisé comme édulcorant ; c'est l'aspartyl-phényl alanine méthyl ester.

NH_2—CH—CO—NH—CH—CO—O—CH_3
(1er CH : CH_2—COOH ; 2e CH : CH_2—C_6H_5)

Aspartam

IV. LA SYNTHÈSE CHIMIQUE DES PEPTIDES

La synthèse chimique des peptides a longtemps achoppé sur le caractère non univoque de la réaction de synthèse d'une liaison peptidique et sur la nécessité d'activer au moins l'un des deux groupements d'atomes qui participent à la réaction.

La technique de Merrifield se caractérise par une synthèse réalisée sur colonne, la chaîne peptidique en voie de croissance étant fixée sur un support solide, et par l'incorporation d'acides aminés présentant la fonction carboxyle activée, la fonction amine masquée et la chaîne latérale éventuellement protégée.

1. LA PRÉPARATION DES ACIDES AMINÉS

Les chaînes latérales de certains acides aminés sont protégées afin de les inactiver chimiquement : la fonction εNH_2 de la lysine est acétylée, les fonctions *SH* de la cystéine et COOH de l'acide aspartique et de l'acide glutamique sont estérifiées, la fonction guanidique de l'arginine est nitrée.

2. LA PRÉPARATION DES GROUPEMENTS COOH ET αNH_2

Le groupement carboxyle de l'acide aminé est activé sous forme d'ester réactif (esters méthylique ou d'alcools plus complexes)

$$H_2N-\underset{\displaystyle R}{\underset{|}{C}H}-CO-OY$$

ou sous forme d'azide

$$H_2N-\underset{\displaystyle R}{\underset{|}{C}H}-CO-N_3$$

En revanche, le groupement αNH_2 est masqué par des radicaux acyle ou oxycarbonyle.

$$X-\underset{\displaystyle O}{\underset{\|}{C}}-NH-\underset{\displaystyle R}{\underset{|}{C}H}-COOH \quad \text{ou} \quad X-O-\underset{\displaystyle O}{\underset{\|}{C}}-NH-\underset{\displaystyle R}{\underset{|}{C}H}-COOH$$

3. LES RÉACTIONS DE CONDENSATION

Imaginons, à titre d'exemple, que l'on fasse la synthèse du tripeptide

$$NH_2-\underset{\displaystyle R_1}{\underset{|}{C}H}-CO-NH-\underset{\displaystyle R_2}{\underset{|}{C}H}-CO-NH-\underset{\displaystyle R_3}{\underset{|}{C}H}-COOH$$

Les acides aminés ont été préparés sous la forme suivante :

$$\underbrace{X-\underset{\displaystyle O}{\underset{\|}{C}}}_{\text{protection de la fonction amine}}-HN-\underset{\displaystyle R}{\underset{|}{C}H}-\underbrace{CO-O-Y}_{\text{activation de la fonction carboxyle}}$$

La première condensation est réalisée en couplant l'acide aminé *C*-terminal à la résine porteuse.

Cette résine se présente sous forme de granules de polystyrène sur lesquelles ont été greffés des groupements réactifs destinés à la fixation du peptide.

Les grains solides se présentent sous forme de petites sphères de 10 à 80 μm de diamètre sur lesquelles on peut fixer de 0,05 à 0,5 millimole par gramme.

$$\underbrace{Cl-CH_2-C_6H_4}_{\text{groupement réactif : chlorure de benzyle}}-\underbrace{\text{copolymère styrène-divinyl-benzène}}_{\text{support}}$$

La première condensation est faite pour lier l'acide aminé qui sera en position *C*-terminale dans le peptide.

$$X{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}HN{-}\underset{\underset{R_3}{|}}{CH}{-}CO{-}O{-}Y \quad + \quad Cl{-}CH_2{-}C_6H_4{-}\text{(support)} \longrightarrow YCl$$

$$X{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}NH{-}\underset{\underset{R_3}{|}}{CH}{-}CO{-}O{-}CH_2{-}C_6H_4{-}\text{(support)}$$

La colonne est ensuite lavée de façon à éliminer l'excès des substances réagissantes et les produits formés.

La fonction amine de l'acide aminé fixé est exposée en démasquant le groupement protecteur :

$$X{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}NH{-}\underset{\underset{R_3}{|}}{CH}{-}CO{-}O{-}CH_2{-}C_6H_4{-}\text{(support)}$$

$$\xrightarrow[H^+]{H_2O} \quad X{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}OH$$

$$H_2N{-}\underset{\underset{R_3}{|}}{CH}{-}CO{-}O{-}CH_2{-}C_6H_4{-}\text{(support)}$$

Bien sûr, chaque opération est suivie d'un lavage de la colonne, destiné à purifier le produit intermédiaire formé.

Le couplage avec le 2[e] acide aminé est rendu possible par la réactivation de la fonction amine du 1[er] acide aminé et l'activation de la fonction carboxyle du second.

$$X{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}NH{-}\underset{R_2}{\underset{|}{CH}}{-}CO{-}OY \;+\; H_2N{-}\underset{R_3}{\underset{|}{CH}}{-}CO{-}O{-}CH_2{-}C_6H_4{-}\text{résine} \xrightarrow{-\,Y{-}OH} X{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}NH{-}\underset{R_2}{\underset{|}{CH}}{-}CO{-}NH{-}\underset{R_3}{\underset{|}{CH}}{-}CO{-}O{-}CH_2{-}C_6H_4{-}\text{résine}$$

La fonction amine est démasquée :

$$X{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}NH{-}\underset{R_2}{\underset{|}{CH}}{-}CO{-}NH{-}\underset{R_3}{\underset{|}{CH}}{-}CO{-}O{-}CH_2{-}C_6H_4{-}\text{résine} \xrightarrow[H^+]{H_2O} X{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}OH \;+\; H_2N{-}\underset{R_2}{\underset{|}{CH}}{-}CO{-}NH{-}\underset{R_3}{\underset{|}{CH}}{-}CO{-}O{-}CH_2{-}C_6H_4{-}\text{résine}$$

Fixation du 3[e] acide aminé

$$X{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}NH{-}\underset{R_1}{\underset{|}{CH}}{-}CO{-}OY \;+\; H_2N{-}\underset{R_2}{\underset{|}{CH}}{-}CO{-}NH{-}\underset{R_3}{\underset{|}{CH}}{-}CO{-}O{-}CH_2{-}C_6H_4{-}\text{résine} \xrightarrow{-\,Y{-}OH} X{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}NH{-}\underset{R_1}{\underset{|}{CH}}{-}CO{-}NH{-}\underset{R_2}{\underset{|}{CH}}{-}CO{-}NH{-}\underset{R_3}{\underset{|}{CH}}{-}CO{-}O{-}CH_2{-}C_6H_4{-}\text{résine}$$

$$\xrightarrow[H^+]{H_2O} X{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}OH \;+\; H_2N{-}\underset{R_1}{\underset{|}{CH}}{-}CO{-}NH{-}\underset{R_2}{\underset{|}{CH}}{-}CO{-}NH{-}\underset{R_3}{\underset{|}{CH}}{-}CO{-}O{-}CH_2{-}C_6H_4{-}\text{résine}$$

puis le peptide est détaché du support par hydrolyse de la liaison ester qui l'y fixe :

$$H_2N{-}\underset{R_1}{CH}{-}CO{-}NH{-}\underset{R_2}{CH}{-}CO{-}NH{-}\underset{R_3}{CH}{-}CO{-}O{-}CH_2{-}C_6H_4{-}\text{(support)}$$

$$\xrightarrow{H_2O} HO{-}CH_2{-}C_6H_4{-}\text{(support)}$$

$$H_2N{-}\underset{R_1}{CH}{-}CO{-}NH{-}\underset{R_2}{CH}{-}CO{-}NH{-}\underset{R_3}{CH}{-}COOH$$

Toutes ces opérations ont pu être automatisées ; et l'on a pu réaliser selon ce procédé la synthèse de plusieurs peptides hormonaux hypophysaires.

L'obtention de longs peptides a été rendue possible en raccordant entre eux des peptides de 10 à 20 résidus d'acides aminés.

La structure protéique

Les peptides et les protéines sont des composés constitués par un *enchaînement défini d'acides aminés* réunis par des *liaisons peptidiques.* Cette conception, qui semble évidente de nos jours est, en fait, une acquisition relativement récente qui résulte en particulier des travaux analytiques de Sanger (1944). Cet enchaînement ou ***chaîne peptidique,*** linéaire dans sa forme la plus fréquente, possède à une extrémité un groupement α-aminé libre dit *N-terminal,* qui figure par convention à gauche de la formule, et à l'autre extrémité un groupement α-carboxylique dit *C-terminal.*

$$H_2N{-}\underset{R_1}{CH}{-}CONH{-}\underset{R_2}{CH}{-}CONH{-}\underset{R_3}{CH}{-}CONH{-}{-}{-}\underset{R_n}{CH}{-}COOH$$

Groupement N terminal — Liaison peptidique — Résidu d'amino-acide — Groupement C terminal

De nombreuses preuves expérimentales sont venues confirmer l'existence de cette structure. Par exemple :

— L'hydrolyse partielle d'une protéine libère des petits peptides dont la structure est identique aux produits préparés par synthèse.

— Les spectres d'absorption dans l'infrarouge et l'ultraviolet ainsi que les

phénomènes de diffraction des rayons X caractéristiques de la liaison peptidique ont été retrouvés pour les chaînes peptidiques.

— Le nombre de fonctions aminées et carboxyliques titrables, initialement très faible dans la chaîne peptidique s'accroît au fur et à mesure de l'hydrolyse coïncidant d'ailleurs avec la libération d'acides aminés.

— Certaines molécules ont été synthétisées en totalité.

Il est facile de prévoir une *grande diversité* des composés protéiques selon :

— le nombre total des résidus (deux, dix, cinquante, quelques centaines) ;

— la nature et le nombre de chaque type de résidu présent dans la molécule (4 Ala, 10 Gly, 2 Val, ...) ;

— la succession de ces résidus ou séquence des acides aminés (Gly—Ala—Glu—Val ou Ala—Val—Glu—Gly) ;

— les complications structurales aboutissant à des formes cycliques, semi-cycliques (par combinaison d'un groupement terminal avec une chaîne latérale ou avec l'autre groupement terminal) ou plus complexes (par interaction entre les différentes chaînes latérales).

L'étude de cette structure va nous permettre de préciser ces différents facteurs. Elle nécessite l'obtention du composé à l'état pur et représente un travail analytique considérable basé sur des méthodes souvent complexes. Nos connaissances dans ce domaine se sont considérablement accrues depuis l'automatisation des techniques qui a permis un travail plus rapide, plus précis et nécessitant seulement très peu de protéine.

I. LA STRUCTURE PRIMAIRE

La structure primaire des protéines est représentée par la séquence des acides aminés, sa détermination se fait selon les méthodes classiques de l'analyse biochimique, ou bien en utilisant des méthodes automatisées.

A. La composition en acides aminés

La détermination de la *nature exacte* et des *proportions* de chacun des amino-acides constitutifs nécessite une *hydrolyse totale*. C'est généralement une hydrolyse acide, l'hydrolyse enzymatique étant rarement totale et l'hydrolyse alcaline, bien que rapide, provoquant beaucoup d'altérations et de remaniements structuraux. L'opération est difficile et doit être réalisée par des moyens énergiques (HCl 5,7 à 6 mol/l à reflux au bain d'huile à 125 °C ou en tube scellé à 105-110 °C, sous vide ou sous atmosphère inerte pour réduire les altérations, pendant une durée moyenne de vingt-quatre heures) ; la quantité de substance soumise à l'hydrolyse est faible, 0,5 à 1 % de celle de l'acide. Au cours de la réaction, certains amino-acides sont détruits

(tryptophane), d'autres sont partiellement décomposés ou racémisés, enfin certaines liaisons résistent, d'où la nécessité d'adapter des variantes opératoires aux cas particuliers.

L'identification et le dosage des acides aminés ainsi libérés sont réalisés par les différentes méthodes évoquées à leur propos (p. 74). Les résultats sont évalués soit :

— en pourcentage pondéral (grammes d'acide aminé pour 100 g de protéine pure) ;

— en nombre de résidus dans une masse arbitraire de 1.000 ou 10.000 g ;

— en nombre de résidus dans une molécule quand la masse molaire a été déterminée. Il est possible alors de dresser une formule brute du type : Ala 3, Arg 3, Asp 2, Glu 5, Gly 3, His 1, ...

B. La masse moléculaire

Son mode de détermination dépend de sa valeur. Pour les petites molécules, les méthodes physicochimiques classiques (cryoscopiques) sont utilisables. Elles ne le sont plus pour les macromolécules protéiques car ou bien la protéine ne peut pas être placée dans les conditions nécessaires (trop peu soluble par exemple), ou bien les grandeurs à mesurer sont trop faibles (de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-4} degré pour la méthode cryoscopique). Il faut alors utiliser d'autres méthodes.

— L'une des **méthodes chimiques** consiste à doser avec précision l'acide aminé présent dans la molécule au taux le plus faible. Comme celle-ci renferme au moins un résidu de l'amino-acide on en déduit une *masse moléculaire minimum*. La masse moléculaire réelle correspond, généralement, à un multiple de cette valeur du fait que le résidu est rarement unique.

Ex. : Si l'analyse d'une protéine révèle que le taux le plus faible est de 0,4 % pour le tryptophane (masse molaire 304 g),

1 g de tryptophane est donc contenu dans 100/0,4 = 250 g de protéine et 1 mole, soit 304 g, correspond à $250 \times 304 = 76.000$ g. Valeur qui représente la masse molaire minimum.

— Les **méthodes physiques** découlent des propriétés physiques des solutions protéiques et seront étudiées à ce propos. Il faut noter, cependant, que la grandeur mesurée est liée à la taille des particules en solution. Si celles-ci sont homogènes et monomoléculaires, le résultat correspond effectivement à la masse moléculaire. Dans les autres cas, le résultat, généralement variable d'une méthode à l'autre, représente un multiple de la masse moléculaire vraie.

De toute façon, ces différentes techniques laissent une incertitude souvent voisine de 10 %.

— Les **méthodes chromatographiques et électrophorétiques** sont fondées sur la migration des protéines dans un solide poreux. Le tamisage moléculaire est une chromatographie dans laquelle la phase stationnaire est un gel réticulé. Cette technique permet la détermination des masses moléculaires, car les particules séparées sont éluées en raison inverse de leur masse ; le volume d'élution est d'autant plus grand que la masse moléculaire est faible. La colonne est calibrée à l'aide de

protéines pures de masses moléculaires connues, puis les protéines à étudier sont chromatographiées à leur tour.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide avec SDS (sodium dodécyle sulfate) est une technique dans laquelle les mobilités électrophorétiques des protéines sont rendues sensiblement égales ; dans ces conditions, le déplacement, sous l'effet du champ électrique appliqué, au sein du gel est fonction de la masse moléculaire de la protéine et de sa forme.

Ces méthodes sont rapides, mais relativement imprécises.

— Les **résultats** sont extrêmement variés ; ils vont de 132, masse molaire du dipeptide glycyl-glycine, à *des masses moléculaires de* 10^6 *daltons et plus.* Sur ces valeurs sont établies les coupures, toutes arbitraires, de la classification des protides.

Les ***peptides,*** composés dialysant au travers d'une membrane de cellophane, ont une masse moléculaire inférieure à 10 000 daltons, ce qui correspond à moins de 100 résidus d'acides aminés. On parle d'***oligopeptides*** pour ceux renfermant moins de 10 résidus et de ***polypeptides*** pour les autres.

Les ***protéines,*** composés macromoléculaires de masse moléculaire supérieure à 10^4 daltons, résultent de la condensation d'un nombre élevé de molécules d'acides aminés, plus de cent, parfois plusieurs centaines.

Ex. :

Rinobucléase	12 700 dal
Myoglobine	17 000 dal
Trypsine	24 000 dal
Ovalbumine	44 000 dal
Sérumalbumine	69 000 dal
Fibrinogène	330 000 dal
Uréase	480 000 dal
Hémocyanine	> 1 000 000 dal

Dans un certain nombre de cas, en particulier pour des protéines enzymatiques, la masse moléculaire mesurée correspond à un assemblage de sous-unités par des liaisons non covalentes et selon un mode spécifique (p. 100). C'est en fait la « masse moléculaire » de l'unité biologiquement fonctionnelle.

C. Les groupements terminaux libres

Leur existence et leur nombre permettent de connaître la forme moléculaire d'une chaîne peptidique (linéaire, semi-cyclique, cyclique) ou le nombre de chaînes constituant une molécule de protéine.

1. MÉTHODES CHIMIQUES

Elles consistent à préparer, à partir du peptide ou de la protéine, un dérivé caractéristique de la fonction aminée ou carboxylique, à isoler ce dérivé puis à l'identifier et à le doser.

— L'*ancienne méthode de* **Sanger** permet d'identifier les résidus N-terminaux. La protéine est traitée en milieu légèrement alcalin par une solution alcoolique de *dinitrofluorobenzène* (DNFB) qui réagit sur les groupements aminés libres selon l'équation décrite, p. 72. Le DNP peptide, ou le DNP protéine, obtenu, généralement insoluble, est isolé, purifié puis hydrolysé en milieu acide. Les DNP amino-acides sont extraits de l'hydrolysat par l'éther, identifiés et dosés par chromatographie et spectrophotométrie. La méthode est, en fait, un peu plus complexe par suite de la présence d'acides aminés basiques à groupements NH_2 libres et d'une hydrolyse partielle des DNP amino-acides. De plus, il est impossible de procéder par récurrence puisque l'hydrolyse fragmente le composé protéique.

— *La méthode d'***Edman,** plus récente, permet au contraire une analyse par récurrence. Elle a été automatisée dans un appareil conçu par l'auteur de la méthode, le « Séquenator », qui accélère considérablement les opérations et améliore le rendement en éliminant certains artefacts (p. 91). Dans cette méthode, le groupement N terminal est condensé en milieu alcalin avec le phénylisothiocyanate pour former un peptide N-phényl thiocarbamylé.

En milieu acide, il se produit une cyclisation avec rupture de la liaison peptidique et libération d'un phénylthiohydantoïne-amino-acide (PTH amino-acide) que l'on peut isoler, puis facilement identifier par chromatographie et doser par spectrophotométrie.

$$C_6H_5{-}N{=}C{=}S + \underset{n_1 \text{ résidus}}{H_2N{-}\underset{R_1}{CH}{-}CONH{-}\underset{R_2}{CH}{-}\cdots} \xrightarrow{OH^-} R_1{-}CH(NH{-}C(=S){-}NH{-}C_6H_5){-}CONH{-}\underset{R_2}{CH}{-}\cdots$$

$$\xrightarrow{H^+} \underset{\text{PTH amino-acide}}{\underbrace{R_1{-}CH{-}CO{-}N(C_6H_5){-}C(=S){-}NH}_{\text{cycle}}} + \underset{(n-1)\ \text{résidus}}{H_2N{-}\underset{R_2}{CH}{-}\cdots}$$

La chaîne peptidique à $(n - 1)$ résidus peut alors être engagée dans un nouveau cycle.

2. MÉTHODES ENZYMATIQUES

Les exopeptidases sont des enzymes qui catalysent spécifiquement la libération par hydrolyse des résidus terminaux d'une chaîne peptidique. Les carboxypeptidases (A et B) pancréatiques attaquent les extrémités C terminales. La leucine aminopepti-

dase, extraite du rein, hydrolyse les liaisons N terminales de tous les L amino-acides à l'exception de la proline.

$$\underset{\substack{R_{n-1} \\ n \text{ résidus}}}{\text{—CONH—CH—}}\text{CONH—}\underset{R_n}{\text{CH}}\text{—COOH} + H_2O \xrightarrow[\text{Carboxypeptidase}]{} \underset{\substack{R_{n-1} \\ (n-1) \text{ résidus}}}{\text{—CONH—CH—COOH}} + \underset{\substack{R_n \\ \text{A. A. terminal}}}{H_2N\text{—CH—COOH}}$$

L'acide aminé libéré est extrait et identifié. L'enzyme peut d'ailleurs poursuivre son action sur la chaîne à $(n-1)$ résidus, ce qui permet d'identifier les trois ou quatre derniers résidus par récurrence. Toutefois, les conditions de l'hydrolyse varient beaucoup selon la nature de l'acide aminé terminal.

D. La séquence des acides aminés

a. Les méthodes traditionnelles

Connaissant la formule brute et les groupements terminaux, il reste à déterminer la succession des acides aminés dans la chaîne peptidique. La méthode consiste à réaliser des *hydrolyses partielles,* pour découper la molécule en petits fragments, di, tri, tétrapeptide sur lesquels il est possible de déterminer la séquence grâce aux techniques précédentes. La comparaison et l'assemblage des divers fragments permet de reconstituer la séquence initiale.

Soit un hexapeptide de formule brute A, B_2, C, D, F. La méthode de Sanger permet de conclure que le groupement α-aminé terminal appartient à l'amino-acide A, la carboxypeptidase détache l'acide aminé B puis le D. Nous pouvons donc lui attribuer la formule : A-(B, C, E)-D-B.

L'hydrolyse partielle libère des dipeptides de structure *A-C, C-B, E-D, D-B* et des tripeptides *C-B-E* et *B-E-D*. Si nous assemblons ces fragments comme un « puzzle », la séquence se trouve ainsi déterminée :

```
A-C
  C-B-E-D
        D-B
  C-B-E
    B-E-D
-----------
A-C-B-E-D-B
```

Les hydrolyses chimiques partielles sont réalisées en abaissant la température, la concentration du réactif ou la durée du chauffage. Le nombre de fragments obtenus est généralement élevé.

Les *hydrolyses partielles enzymatiques* nécessitent l'utilisation d'enzymes rompant les liaisons peptidiques à l'intérieur des chaînes *(endopeptidases)* contrairement aux exopeptidases. Leur action est, de plus, assez spécifique d'un type de liaison.

Ex. : La *pepsine* scinde préférentiellement les liaisons incluant la fonction

amine de la tyrosine ou de la phénylalanine. La *trypsine* coupe spécifiquement les liaisons arginyl et lysyl :

—Arg—Ala— —Lys—Ala—
↑ ↑
Trypsine Trypsine

b. Les méthodes automatisées

Ces méthodes sont fondées sur la réaction d'Edman (p. 89). L'acide aminé *N* terminal réagit avec le phénylisothiocyanate, le *PTH* amino-acide qui en résulte est identifié, puis la chaîne peptidique, amputée de son extrémité *N* terminale est traitée à son tour selon cette technique.

Toutes les opérations sont réalisées automatiquement par des appareils appelés séquenceurs.

Cette technique ne s'applique qu'à des oligopeptides de l'ordre d'une quinzaine d'acides aminés.

Il n'est guère possible de traiter des peptides plus longs, en effet, la réaction n'est pas rigoureusement totale, de sorte que, très rapidement il s'installe une désynchronisation qui brouille les résultats.

L'analyse de la séquence des protéines requiert une fragmentation préalable des longues chaînes peptidiques en oligopeptides.

Les coupures intracaténaires peuvent être réalisées par voie enzymatique (coupure à la trypsine par exemple) ou par voie chimique.

Par cette dernière voie, on peut utiliser le bromure de cyanogène (BrCN) qui coupe les liaisons peptidiques dans lesquelles sont engagés les groupements carboxyle des résidus de méthionine.

Cet acide aminé étant peu représenté, le nombre de coupures, par molécule protéique, est limité.

c. Les méthodes de séquençage fondées sur le génie génétique

Le séquençage d'un ADN est beaucoup plus facile à réaliser que celui d'une protéine (p. 213).

Partant de cette idée, on va, dans un premier temps, isoler le morceau d'ADN qui codera la protéine à étudier.

Les méthodes de génie génétique qui permettent de cloner et d'isoler un gène ne seront pas décrites, elles sortent du cadre de cet ouvrage.

Le fragment d'ADN est séquencé ; connaissant le code génétique, c'est-à-dire la correspondance existant entre un triplet de bases de l'ADN et un acide aminé de la protéine, on déduit la structure primaire protéique de la séquence de l'acide nucléique.

E. Résultats

La structure primaire complète, d'abord déterminée sur l'insuline, dont la molécule est formée de deux chaînes (chaîne *A* 21 résidus, chaîne *B* 30 résidus), est maintenant connue :

— pour les oligopeptides et de nombreux polypeptides (hormones en particulier) ;

— pour des protéines ; ribonucléase, lysozyme, cytochrome *C*, protéine du virus de la mosaïque du tabac, fraction protéique de la myoglobine et de l'hémoglobine ou globine, etc.

Ex. : La globine de l'hémoglobine humaine normale est constituée par quatre chaînes, deux chaînes α de 141 résidus et deux chaînes β de 146 résidus dont les séquences sont connues.

Ces résultats sont encore fragmentaires ; il faut toutefois leur ajouter la connaissance de nombreuses séquences partielles.

A partir de ces exemples connus, il nous est possible de dégager quelques conclusions.

— Dans les molécules de polypeptides et de protéines les différents *acides aminés ordinaires sont généralement présents.* Mais alors que certains sont abondants (alanine, acide glutamique, etc.), d'autres ne sont que faiblement représentés (thréonine, méthionine, etc.).

— Les amino-acides sont répartis dans les chaînes peptidiques sans *aucune périodicité,* il n'y a pas répétition d'un motif de base.

— Les différentes molécules d'une protéine provenant d'une espèce donnée présentent toujours la *même séquence.* Il faut donc admettre l'existence d'un contrôle lors de la formation de cette séquence et la transmission de ce contrôle à la descendance. *Ce contrôle permanent est donc stable et héréditaire.*

— Les résidus n'ont pas tous la même importance ni le même rôle dans la chaîne peptidique. Ce résultat, obtenu par dégradation partielle des chaînes peptidiques et par comparaison des globines d'une part et des hormones peptidiques d'autre part, permet de distinguer :

• des **résidus indispensables.** — Par leur nature et leur position, leur absence entraîne la perte des propriétés caractéristiques. Ces séquences indispensables au fonctionnement sont identiques ou tout au moins voisines pour les différentes espèces. Elles établissent un *rapport entre la structure primaire et l'activité biologique ;*

• des **résidus non indispensables.** — Ces séquences sont pour les unes communes à plusieurs espèces, sans doute en rapport avec une structure ancestrale, unique ; pour les autres variables selon l'espèce et confèrent ainsi une *spécificité* qui peut être liée aux diverses étapes de l'évolution, d'où l'intérêt phylogénique.

Ex. : La chaîne β de l'hémoglobine du Gorille diffère de la chaîne β humaine par un seul résidu, le 104 (arginine chez le Gorille, leucine chez l'Homme). Les chaînes β du Porc et du Cheval en diffèrent par 9 et 25 résidus.

Cette individualité, qui se manifeste lors de l'analyse (séparations électrophorétiques, réactions immunologiques), peut avoir pour origine la modification d'un seul résidu de la séquence.

Ex. : Les hémoglobines pathologiques humaines séparables de l'hémoglobine normale par électrophorèse ne diffèrent de celle-ci que par très peu de résidus. Les hémoglobines falciforme *S* et anémiante *C* résultent du remplacement de l'acide glutamique, sixième résidu de la chaîne β normale, respectivement par la valine et la lysine.

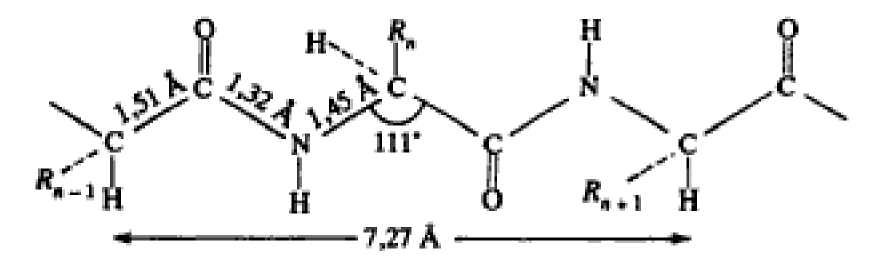


Figure 4.10 Structure peptidique primaire.

— Les *caractéristiques géométriques de la structure primaire* sont liées aux covalences dirigées.

Dans les peptides et les protéines la liaison peptidique dont les caractéristiques ont été précisées (p. 71) unit des amino-acides appartenant presque exclusivement à la série *L*.

Elle n'est pas influencée par les chaînes latérales, sauf en ce qui concerne les imino-acides (proline surtout) qui par leur structure cyclique introduisent une brusque courbure à leur niveau.

L'axe de la molécule est formé par une ligne brisée dont les angles et les distances interatomiques sont déterminés et sur laquelle font saillie les chaînes latérales qui alternent régulièrement (fig. 4.10).

Pour simplifier les schémas, cette chaîne sera représentée rectiligne par la suite. La longue molécule qui est ainsi formée (polypeptides, protéines) est flexible. Elle présente des possibilités de libre rotation au niveau des groupements CH et, par suite d'interactions entre les différents radicaux, peut se replier pour aboutir à une structure spatiale complexe.

— Les *complications structurales*. Elles correspondent aux structures secondaire, tertiaire et quaternaire et conduisent à deux formes moléculaires : les *molécules fibreuses* et les *molécules globulaires*. La détermination de ces structures résulte de prévisions théoriques (considérations énergétiques, encombrement stérique) et de mesures physiques (spectres de diffraction des rayons X, spectres ultraviolet et infrarouge, fluorescence, résonance magnétique nucléaire, etc.) qui sortent du cadre de notre étude.

II. LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DES PROTÉINES

La structure primaire d'une protéine est insuffisante pour rendre compte de la forme de la molécule. La chaîne peptidique adopte une configuration tridimensionnelle qui est unique et constante pour une espèce protéique donnée.

On appelle structure secondaire celle qui est représentée par les replis ou les enroulements de la chaîne engendrés par les relations qui s'établissent entre des acides aminés proches les uns des autres dans la structure primaire.

On appelle structure tertiaire, l'organisation spatiale de la molécule résultant des liaisons qui s'établissent entre des acides aminés éloignés dans la structure primaire.

La distinction entre structures secondaire et tertiaire est approximative et arbitraire.

Certaines grosses protéines font apparaître, dans leur structure, des zones de reploiement, appelées domaines, de formes globulaires, et correspondant à des unités de masse moléculaire de 10.000 à 25.000 daltons. Les domaines sont reliés entre eux par la chaîne peptidique dans un état assez peu organisé.

La structure quaternaire résulte de la juxtaposition de sous-unités protéiques, appelées monomères dans une protéine oligomérique.

La connaissance de la dimension, de la forme, du relief des protéines, permettrait d'établir de façon satisfaisante la relation existant entre structure et fonction ; mais les résultats collectés dans ce domaine sont trop peu nombreux, de sorte que les conclusions tirées ne sont que très limitées.

A. La structure secondaire

Les études de cristallographie appliquées aux protéines témoignent d'une structure organisée sub-cristalline.

L'analyse des diagrammes de diffraction de rayons X, portant sur une protéine cristallisée, a fait apparaître une certaine périodicité dans la structure ; elle a permis, en outre, d'établir la forme de la chaîne peptidique et la position des chaînes latérales.

Le type de structure secondaire constituant la molécule est en liaison avec la forme globulaire ou fibreuse de celle-ci.

a. Les protéines fibreuses

Ce sont essentiellement des protéines de structure comme les kératines, la fibroïne de la soie, le collagène, la myosine du muscle.

Les protéines fibreuses présentent des structures répétitives appartenant à plusieurs modèles.

L'hélice α

Les protéines du type α-kératine, comme celle de la laine par exemple, sont essentiellement constituées d'hélice α.

Dans cette structure, postulée par Pauling et Corey en 1951, la chaîne peptidique s'enroule en une hélice dextrogyre, autour d'un axe, formant une sorte de ressort à boudin.

Les caractéristiques de l'hélice α (fig. 4.11A) sont les suivantes :

— La *zone centrale* de la molécule est constituée par une succession de plans contenant les liaisons peptidiques et faisant entre eux des angles de 80°. L'articulation entre deux plans successifs a lieu au niveau d'un carbone α.

— Les *chaînes latérales* sont dirigées vers l'extérieur, elles peuvent réagir entre elles et avec le milieu.

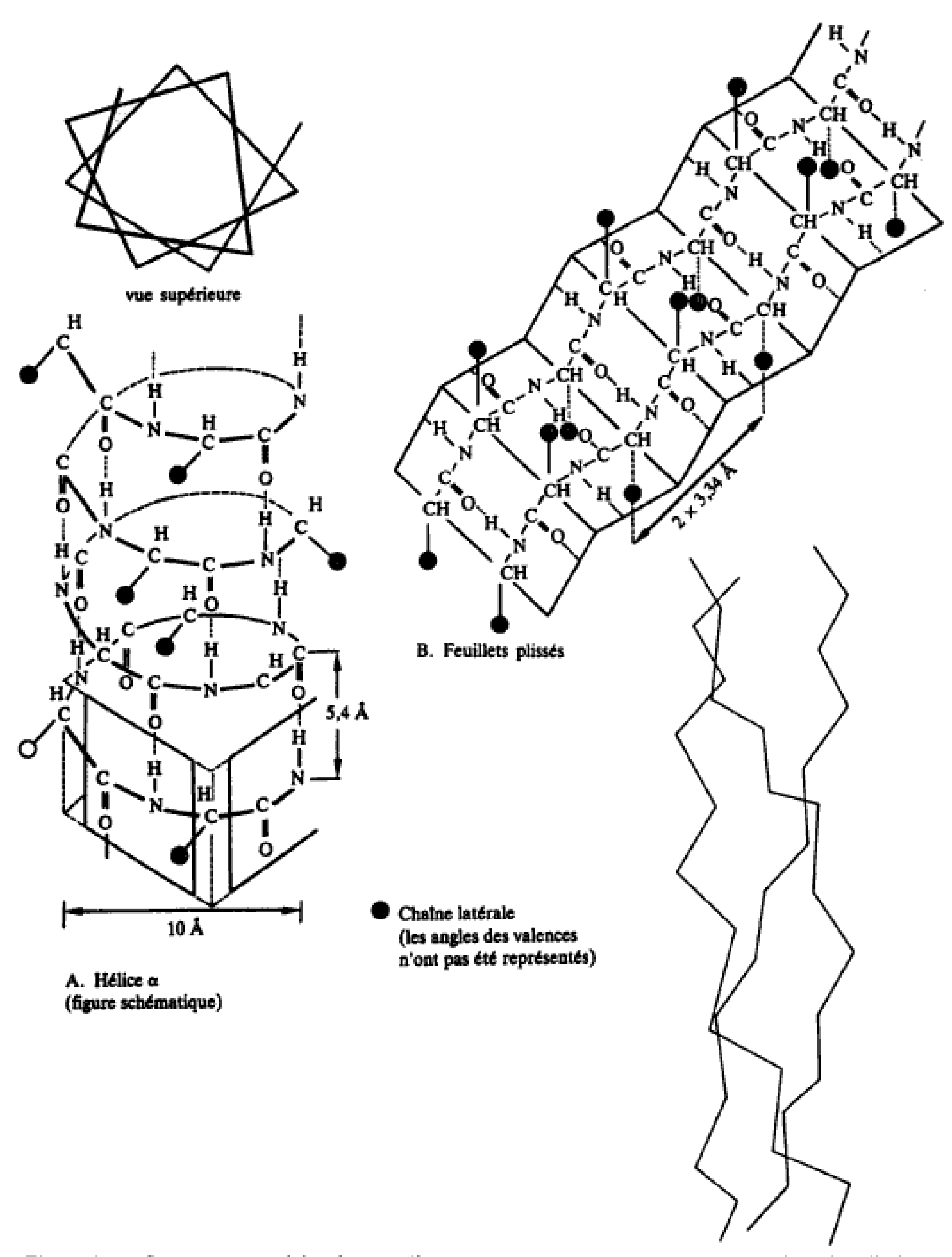


Figure 4.11 Structure secondaire des protéines.

— Cette *hélice* comprend 3,6 résidus par tour soit dix-huit résidus pour cinq tours.

L'état hélicoïdal, qui est une forme contractée, est stabilisé par un maximum de *liaisons hydrogène intramoléculaires* au niveau de chaque tour de spire. Ces liaisons hydrogène qui s'établissent entre les groupements CO et NH de deux liaisons peptidiques séparées par trois résidus ont une longueur constante de 2,9 Å ± 0,1 Å. Les tensions sont particulièrement réduites, ce qui confère une grande stabilité.

Il n'y a pas place dans cette structure quasi cristalline pour la proline dont la présence introduit une cassure dans la régularité de cette disposition.

Les feuillets plissés β

La structure en feuillets plissés β, que l'on trouve dans la fibroïne de la soie, résulte de l'union de chaînes polypeptidiques par un maximum de liaisons hydrogène perpendiculaires à l'axe de la molécule. Les chaînes sont disposées parallèlement en une structure en zig-zag (fig. 4.11B), les replis se font au niveau des carbones en α des acides aminés.

Les chaînes latérales des résidus se placent alternativement au-dessus et au-dessous du plan général du feuillet. Cette structure, moins fréquente que l'hélice α, peut être obtenue artificiellement par un étirement d'environ 30 % d'α kératines.

Les fibres de collagène

Le collagène possède une configuration particulière en triple hélice en rapport avec sa structure primaire caractéristique (le collagène est riche en glycine, proline et hydroxyproline) (fig. 4.11C).

b. Les protéines globulaires

Elles présentent une très grande importance fonctionnelle puisque pratiquement la totalité des protéines douées d'une activité biologique, en particulier les enzymes, possèdent une structure globulaire.

Certaines protéines globulaires sont principalement constituées d'hélices α, d'autres sont sous forme de feuillets β, de nombreuses possèdent à la fois des hélices α et des feuillets β. Chez ces dernières, de courts fragments d'hélice α et de feuillets β peuvent s'assembler en complexes appelés unités de reploiement de type αα, ββ, αβ etc.

Dans de nombreuses protéines, on a repéré une unité de reploiement fréquemment représentée, constituée de 2 brins β reliés par un segment d'hélice α.

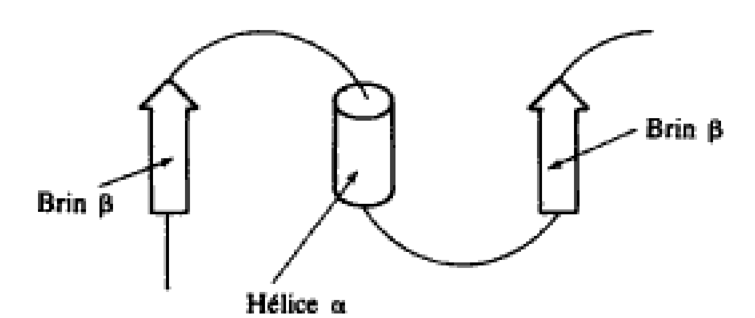


Figure 4.12 L'unité de reploiement βαβ.

Les proportions d'hélice et de brins β sont variables d'une protéine à l'autre.

B. La structure tertiaire

Dans une molécule globulaire, la chaîne peptidique prend une configuration qui comporte des zones densément organisées en hélice α et/ou en brins β, que l'on appelle les unités de reploiement, et des zones plus lâches dans lesquelles s'effectuent les changements de direction.

De nombreux replis de la chaîne se font sous forme de coudes β. Cette structure est stabilisée par des liaisons hydrogène entre les C=O et les NH d'un acide aminé et de son homologue situé trois rangs plus loin.

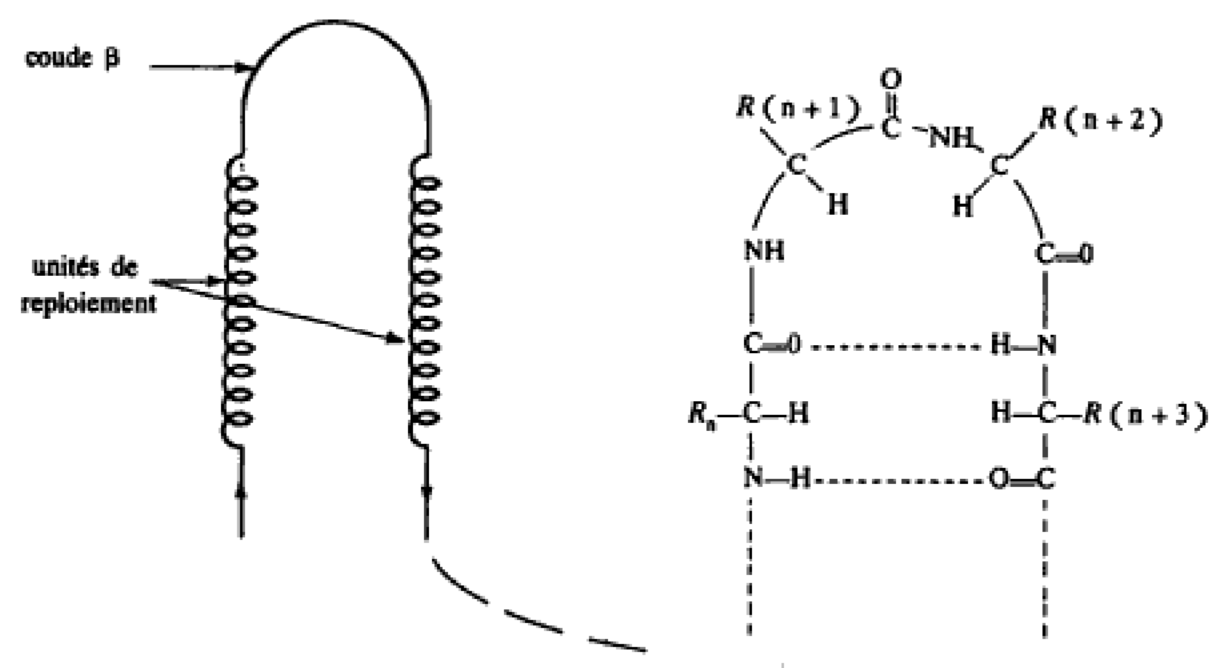


Figure 4.13 Structure d'un coude β.

La structure tertiaire, définie et stable, conduit à une forme générale plus ou moins sphérique ou ellipsoïdale de la molécule, est liée à l'existence de nombreuses liaisons secondaires entre les chaînes latérales des résidus d'acides aminés.

a. Les liaisons secondaires

— Les *liaisons covalentes,* par mise en commun d'une paire d'électrons. La seule importante est la liaison disulfure —S—S— et, beaucoup plus exceptionnellement pour les protéines, la liaison phosphodiester (caséine).

— Les *liaisons ioniques,* entre groupements chargés de signe contraire. En solution, la solvatation affaiblit beaucoup ces liaisons.

— Les *interactions électrostatiques,* entre dipôles permanents et groupements ionisés ou entre deux dipôles permanents. C'est à ce groupe qu'appartiennent les liaisons hydrogène.

—O—H···O=C<   >N—H···O—C(=O)—

— Les attractions de Van der Waals, liées à l'existence de vibrations moléculaires dont sont responsables des forces électrostatiques entre des dipôles non permanents.

— Les attractions hydrophobes entre radicaux de ce type qui s'attirent par répulsion vis-à-vis du solvant aqueux.

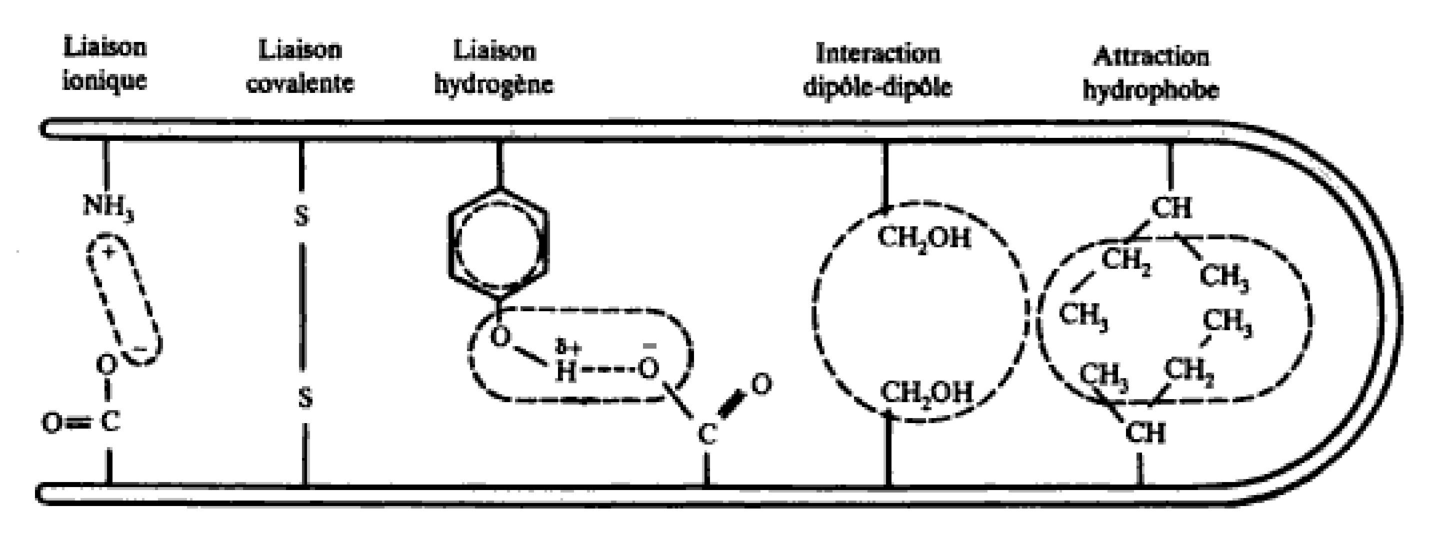


Figure 4.14 Liaisons secondaires (les distances interatomiques ne sont pas respectées) (d'après G. Schapira).

A l'exception des liaisons covalentes, ces liaisons secondaires sont *faiblement énergétiques,* sensiblement de 1 à 7 kcal/mol (4 à 30 kJ/mol) les liaisons hydrogène étant parmi les plus fortes, les liaisons hydrophobes parmi les plus faibles. En d'autres termes, elles ne se manifestent que pour de très faibles distances entre les atomes ou les groupements. Il en résulte que, prises individuellement, ces liaisons peuvent se rompre et se reformer sans variation énergétique importante et qu'elles ne deviennent vraiment efficaces que par leur nombre. Pour que deux molécules ou deux zones moléculaires puissent ainsi se lier par plusieurs liaisons, efficaces seulement sur de très faibles distances, il est nécessaire que le rapprochement soit possible, c'est-à-dire que leurs *surfaces soient complémentaires.*

b. Conséquences de la structure tertiaire

La structure tertiaire n'est complètement connue que pour quelques protéines (fig. 4.15). Pour d'autres, on a réussi à établir la topographie d'une partie seulement de la molécule, d'un site.

L'existence d'une structure protéique tertiaire a des conséquences importantes.

• Elle est à l'origine de l'architecture, de la *forme,* de la molécule de protéine dont la surface présente des saillies et des encoches d'aspect et de position définis.

• Les grosses protéines peuvent être constituées de plusieurs domaines reliés par des zones lâches de la chaîne peptidique, par exemple, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase est constituée de deux domaines.

• Les repliements de la chaîne peptidique aboutissent à une *structure compacte,* par suite du rapprochement des chaînes latérales, ne laissant de place qu'à très peu de molécules d'eau et constituant un milieu non aqueux.

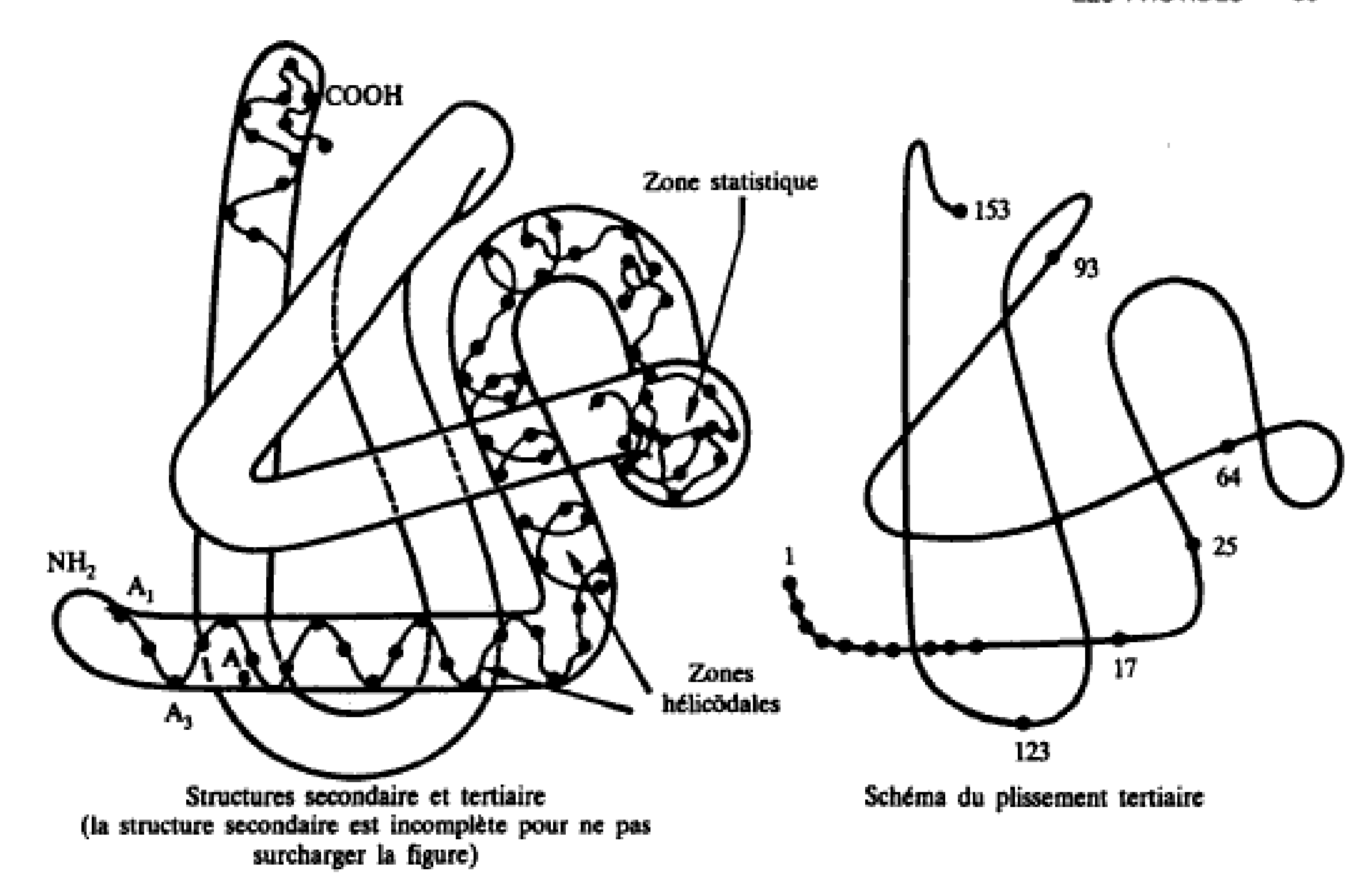


Figure 4.15 Structure tertiaire de la partie protéique de la myoglobine (d'après Perutz et Zuckerkandl).
● Résidu d'amino-acide.

• La *répartition des résidus d'amino-acides* est très différente de celle que pouvait laisser prévoir la structure primaire. Des résidus éloignés dans la séquence peuvent se trouver voisins dans la structure tertiaire.

Ex. : Dans la myoglobine de cachalot, les résidus 15 et 117 sont voisins l'un de l'autre.

Ces rapprochements contribuent à la formation au sein de la molécule protéique de zones particulières, dont certaines sont indispensables aux fonctions de la protéine : on parle alors de *site actif.*

A cet égard, l'étude des structures créées par les unités de reploiement montre que les sites actifs doivent leur spécificité à des assemblages d'unités de reploiement (hélice α et feuillets β) plutôt qu'à des séquences d'acides aminés, qui peuvent différer d'une protéine à l'autre.

Par exemple, le NAD^+, coenzyme de transhydrogénation, se fixe sur les enzymes au niveau d'un motif constitué de deux hélices α et de trois feuillets β.

De plus, on a constaté que dans de nombreux cas, la plupart des chaînes latérales polaires sont groupées en surface offrant la possibilité de liaisons externes avec d'autres composés ou avec le milieu aqueux, alors que les radicaux apolaires se trouvent en majorité en profondeur unis par des attractions hydrophobes. Cette répartition selon le *caractère hydrophile* ou *hydrophobe* conditionne la forme, donc

les propriétés de la protéine et une modification du milieu ou de la séquence des amino-acides peut entraîner un changement de forme et l'altération des propriétés.

• Par l'intermédiaire de ses résidus superficiels, une protéine peut se lier de façon plus ou moins stable avec divers composés protidiques ou non. Ces *associations* nécessitent généralement une certaine complémentarité des surfaces de laquelle résulte une ***spécificité stérique.***

• Cette structure, *la plus stable* du point de vue thermodynamique dans les conditions usuelles, peut être assez facilement altérée par suite du faible niveau énergétique des liaisons. *L'édifice protéique est fragile.*

C. La structure quaternaire

La structure quaternaire correspond à l'*association spécifique* de plusieurs chaînes peptidiques en une unité d'ordre supérieur seule capable d'assurer complètement les fonctions biologiques. Une telle protéine, dite *oligomère* (hémoglobines, enzymes comme la thréonine désaminase ; la glutamate déshydrogénase, etc.) est constituée par l'association de plusieurs chaînes peptidiques ou *protomères* (deux chaînes α et deux chaînes β pour l'hémoglobine humaine normale).

L'assemblage réalisé par des liaisons secondaires se fait de façon spécifique et selon une certaine symétrie (fig. 4.16). *Il conditionne l'activité de la protéine.*

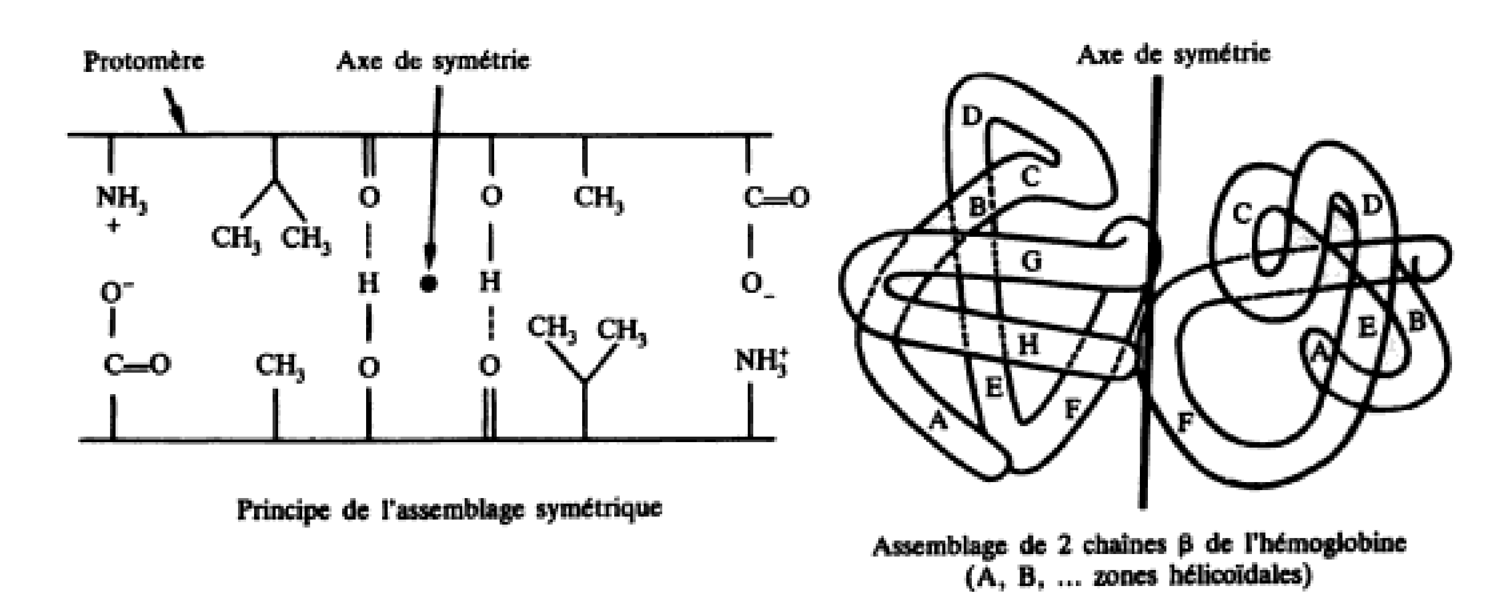


Figure 4.16 Structure quaternaire des protéines (d'après Changeux, Muirhead et Perutz).

III. LES ASSOCIATIONS MOLÉCULAIRES

Les molécules protéiques peuvent également s'associer entre elles, de façon non fonctionnelle, au point de constituer de véritables solutions solides très difficiles à fractionner, ou se lier à des substances non protéiques (ions, glucides, lipides, divers composés organiques) ; on dit alors *protéines conjuguées*. Dans ce dernier cas, les sites d'association et les modes de liaison ne sont pas toujours connus avec précision.

Les composés ainsi constitués, stables ou facilement dissociables selon les cas, présentent souvent des propriétés nouvelles par rapport à chacune des fractions prises isolément. Ce sont des composés importants du métabolisme dont la suite de notre étude nous permettra de préciser la structure (hétéroprotéines, enzymes).

Enfin au-dessus de cette architecture biochimique, il existe une organisation cellulaire qui réunit ces molécules en unités subcellulaires.

IV. LA DÉNATURATION

La dénaturation est une *désorganisation de la structure interne* (structures secondaire, tertiaire, quaternaire) des édifices protéiques sans rupture de liaison peptidique, ce qui la différencie de l'hydrolyse. La *protéine dénaturée* correspond à un état plus ou moins désordonné par rapport à l'état hautement organisé de la *protéine native*. L'exemple classique correspond à la thermocoagulation de l'ovalbumine du blanc d'œuf, mais très souvent la dénaturation est beaucoup moins apparente.

A. Les étapes

Selon l'importance de la dénaturation, c'est-à-dire selon les modifications de la forme moléculaire par suite d'altérations des liaisons secondaires qui la stabilisent, les propriétés de la protéine sont plus ou moins transformées.

La structure active de la protéine correspond à l'état natif ; c'est un état ordonné, unique pour une espèce protéique, conditionné par sa structure primaire.

Les états dénaturés, en revanche, sont multiples et variables.

La dénaturation d'une protéine, par la rupture de liaisons secondaires, transforme la macromolécule globulaire en une forme déployée. Cette étape est réversible, la suppression de l'agent dénaturant, permet la renaturation de la protéine.

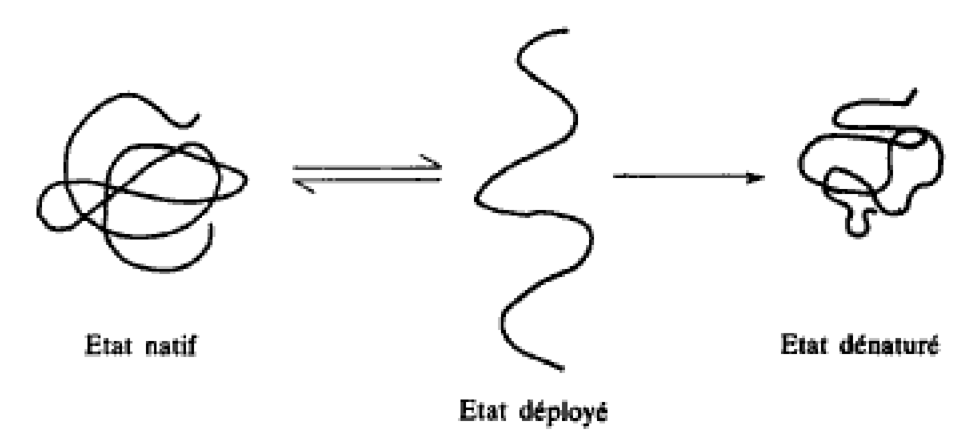


Figure 4.17 Dénaturation réversible et irréversible d'une protéine.

Ceci prouve que l'état natif est unique parce que représentant la structure la plus stable, et qu'une dénaturation douce est un phénomène réversible.

La deuxième étape de la dénaturation consiste en un passage brutal de l'état déployé en un état dénaturé par établissement de liaisons non spécifiques.

Cette étape est réputée irréversible, cependant deux agents chimiques, l'urée ou la guanidine, à forte concentration (6 à 8 mol/l) transforment certaines protéines dénaturées en protéines déployées ; une élimination progressive de ces substances permet d'obtenir la protéine sous forme native.

La dénaturation provoque les changements suivants :

— La *perte des propriétés biologiques* spécifiques est l'une des premières manifestations de la dénaturation, au moins en ce qui concerne les propriétés enzymatiques et hormonales. L'activité immunologique persiste plus longtemps.

— Les *changements de propriétés optiques* se manifestent également de façon précoce.

— La disparition ou l'apparition de propriétés chimiques est liée au *blocage ou au dévoilement de certains groupements* qui étaient inaccessibles dans la protéine native.

— La *diminution de la solubilité* résulte de modifications dans la distribution des groupements polaires et apolaires. C'est l'une des étapes les plus évidentes de la dénaturation. Elle est accompagnée d'une augmentation de la sensibilité aux attaques enzymatiques.

B. Les agents dénaturants

La dénaturation est un processus nécessitant de l'énergie mais les liaisons étant faibles, de nombreux agents, tant physiques que chimiques peuvent en être la cause. Chacun d'eux agit selon un mode plus ou moins spécifique : les acides et les bases modifient les ionisations, font disparaître les liaisons salines ; l'urée entraîne une rupture des liaisons hydrogène ; l'élévation de température qui accroît l'agitation provoque la rupture des liaisons les plus faibles.

Les *facteurs physiques* comprennent :

— L'élévation de température, surtout en milieu acide. Les diverses protéines possèdent d'ailleurs des sensibilités très différentes vis-à-vis de la température.

— Les radiations ultraviolettes et ionisantes. Les ultrasons.

— La dilution des solutions protéiques, leur agitation et l'étalement des protéines en couches minces (dénaturation de surface, mousses).

— Les variations de pH, le maximum de stabilité se situant généralement au voisinage de la neutralité malgré quelques exceptions comme la pepsine.

Parmi les *agents chimiques :*

— Les uns sont faiblement dénaturants (urée et amides, β-mercaptoéthanol, certains anions organiques, solvants organiques à une température voisine de 0 °C).

— D'autres, fortement dénaturants, solubilisent les protéines après précipitation (bases, certains détergents).

— Les derniers enfin, très dénaturants, insolubilisent fortement les protéines ainsi que de nombreux peptides, et permettent leur élimination quantitative d'un milieu. Ils sont utilisés dans ce but en analyse dans les opérations dites de défécation. Ces *déprotéinisants ou défécants* comprennent : des acides (nitrique, trichloracétique, picrique, perchlorique, tungstique), des solutions acides de sels de métaux lourds (sels mercuriques, sels de plomb), des hydroxydes (de cadmium, de zinc), des sels comme le ferrocyanure de zinc. Ces composés sont à la base de nombreux réactifs défécants : réactifs de Courtonne, d'Esbach, de Tanret, etc.

La multiplicité des causes dénaturantes doit être un souci constant lors de la préparation de protéines purifiées aussi proches que possible de l'état natif actif. Par contre, cet effondrement de la structure protéique, sans modification de la composition chimique, qui entraîne la perte des propriétés biologiques en particulier enzymatiques, est recherché dans la désinfection et la stérilisation. Les techniques physiques de stérilisation, les antiseptiques et les désinfectants sont souvent des agents dénaturants entraînant la mort.

Propriétés des protéines

Les protéines sont de constituants caractéristiques de la matière vivante dont l'architecture moléculaire est en rapport avec la multiplicité de leurs propriétés et de leurs comportements.

I. PROPRIÉTÉS PHYSIQUES

A. Aspect

Substances solides, décomposées bien avant la fusion, les protéines se présentent le plus souvent comme des poudres amorphes. Toutefois de nombreuses ont été obtenues à l'état cristallisé (fig. 4.18).

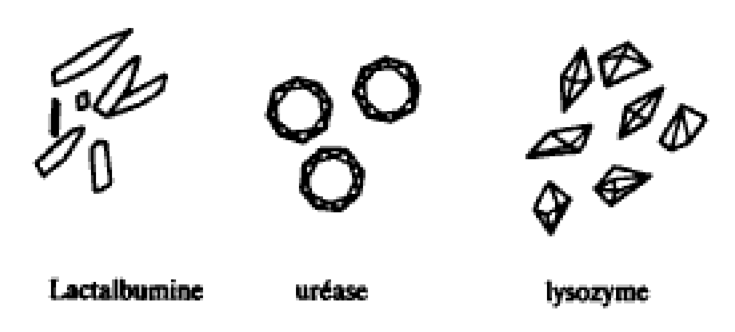


Figure 4.18 Protéines cristallisées (échelles non respectées).

Cette possibilité a fait disparaître l'ancienne opposition entre colloïdes et cristalloïdes. La cristallisation n'est pas, pour les protéines, un critère absolu de pureté mais une série de cristallisations fractionnées permet généralement de purifier soigneusement une fraction protéique.

B. Solubilité

Nous n'envisagerons que la *solubilité aqueuse,* les protéines étant pratiquement insolubles dans les solvants organiques. Seules quelques protéines végétales (prolamines) sont solubles dans les solutions alcooliques de titre élevé, d'où leur mode d'extraction.

La solubilité est variable : les albumines sont solubles dans l'eau pure, les globulines ne sont solubles qu'en présence de faibles quantités de sels neutres ou en milieu légèrement acide ou alcalin ; les *scléroprotéines* (kératines, collagènes) sont insolubles dans toutes ces conditions.

— **Les facteurs de la solubilité.** — La solubilité d'une protéine est principalement conditionnée par la proportion et la répartition des groupes polaires hydrophiles et apolaires hydrophobes. La stabilité de sa solution dépend de la charge électrique et de l'hydratation des molécules. Il en résulte que de nombreux facteurs comme le pH, les sels neutres, les solvants organiques vont influencer le phénomène.

• **Influence de la concentration en électrolytes.** — Les sels neutres (chlorure de sodium, sulfates d'ammonium, de magnésium, de sodium) ont, selon leur concentration, deux actions distinctes sur la solubilité d'une protéine. En fait, c'est non

seulement la concentration mais également la charge des ions, c'est-à-dire la **force ionique** qui intervient. Pour une force ionique faible, on observe un *effet dissolvant ou salting-in effect* (fig. 4.19*A* et *B*) ; pour une force ionique élevée, c'est un *effet de relargage ou salting-out effect* (fig. 4.19*A* et *C*). Entre les deux, se situe une zone de solubilité maximum.

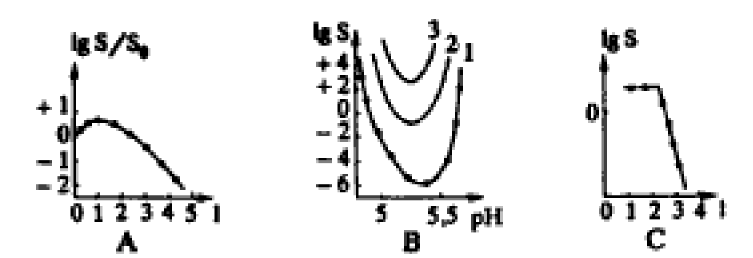


Figure 4.19 Courbes de solubilité : influences de la force ionique *I* et du pH sur la solubilité *S*.
A. Influence de la force ionique sur la solubilité de l'hémoglobine.
B. Influence de la force ionique *I* et pH sur la solubilité d'une globuline (courbe 1, $I = 0{,}001$; 2, $I = 0{,}01$; 3, $I = 0{,}02$).
C. Effet de relargage du sulfate d'ammonium sur la sérumalbumine.

Aux faibles concentrations, les ions résultant de la dissociation du sel neutre réduisent les attractions électrostatiques entre les groupements protéiques chargés, diminuent la cohésion des molécules et favorisent leur hydratation. A forte concentration, par solvatation, ces mêmes ions entrent en concurrence avec les groupements protéiques polaires, les déshydratent d'où l'insolubilisation. L'effet est d'ailleurs réversible par dilution.

• **Influences du pH et de la température du milieu.** — Pour une force ionique donnée et à température constante, la solubilité d'une protéine passe par un minimum pour des valeurs de pH voisines de son pH_i par suite d'un maximum d'attractions électrostatiques à ce pH (fig. 4.19*B*).

L'effet de la température, qui doit demeurer inférieure à celle de la dénaturation, est beaucoup moins général. Le plus souvent la solubilité augmente avec la température, dans quelques cas elle décroît rapidement.

• **Influence des solvants organiques.** — Les solvants organiques miscibles à l'eau, comme l'éthanol et l'acétone, abaissent la constante diélectrique du milieu et l'hydratation des groupements polaires. Ils insolubilisent les protéines, sans les dénaturer si la température est nettement inférieure à 0 °C, en les dénaturant fortement dans le cas contraire.

• **De nombreux autres facteurs** influencent la solubilité protéique. Sans revenir sur les causes de la dénaturation qui bouleverse la répartition des groupements polaires (facteurs physiques, défécants) il faut citer :

— certains cations Zn^{2+}, Hg^{2+} ;

— les complexes formés entre protéines de charges opposées ou de structures complémentaires, les combinaisons avec certains composés organiques et biochimiques (phénols, anions nucléiques, polyholosides acides).

— **Les applications analytiques** de la solubilité sont nombreuses et importantes :

L'*extraction des protéines* d'un broyat ou de fractions cellulaires (noyaux,

mitochondries, ribosomes) est le plus souvent réalisée à l'aide de solutions aqueuses diluées et tamponnées de sels neutres (solutions 0,1 à 0,2 mol/l de chlorures de sodium et potassium, mélanges de mono- et dihydrogénophosphates alcalins).

La *précipitation* d'une protéine et le *fractionnement* d'un mélange protéique peuvent être obtenus en faisant varier les différents paramètres de la solubilité. Les méthodes mises au point par Cohn ont permis d'isoler et de purifier la plupart des fractions protéiques plasmatiques.

La détermination de la *courbe de solubilité* (fig. 4.20) ou de la *constante de relargage* (coefficient angulaire de la droite $\lg S = f(I)$ de la fig. 4.19C), dans des conditions déterminées, constitue l'un des critères de pureté les plus sûrs.

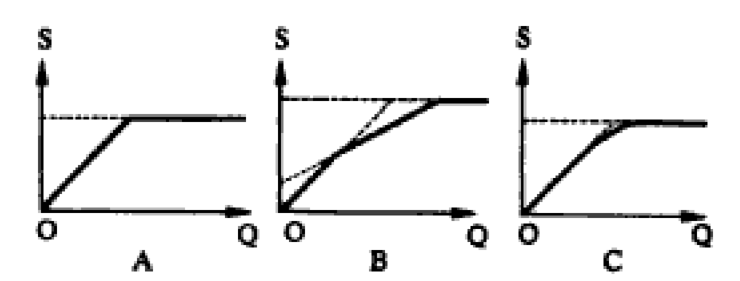


Figure 4.20 Courbes de solubilité.
A. Protéine pure.
B. Mélange de deux protéines qui forment deux phases solides.
C. Mélange de deux protéines isomorphes qui syncristallisent (solution solide) (Q = quantité totale de protéine introduite ; S = quantité de protéine dissoute).

C. Propriétés des solutions protéiques

Les protéines solubles forment avec l'eau des *solutions macromoléculaires monodispersées* (une seule taille de particules), exceptionnellement, par agrégation moléculaire, des solutions polydispersées du type micellaire. Ces solutions, anciennement qualifiées de *colloïdales*, présentent des propriétés particulières liées à la taille et à la forme de ces molécules volumineuses (quelques dizaines à quelques centaines d'angströms).

1. VISCOSITÉ

Les solutions protéiques sont visqueuses, leur viscosité dépend de la forme, de la taille et de la concentration des molécules. Elle est modifiée lors de la dénaturation et augmente avec l'hydratation des particules protéiques (formation de gels).

2. PROPRIÉTÉS OPTIQUES

Les solutions protéiques ne sont pas parfaitement limpides, elles absorbent et diffusent la lumière *(effet Tyndall)*. Les propriétés optiques les plus simples sont en rapport avec :

— la concentration de la solution (indice de réfraction, absorption, diffusion) ;

— la taille et la forme des particules (diffusion en particulier) ;

— la structure chimique de la protéine (absorption ultraviolette à 280 nm due aux résidus aromatiques, pouvoir rotatoire).

La mesure de l'intensité de ces différentes propriétés permet soit un *dosage* de la protéine (méthodes réfractométrique, néphélométrique, turbidimétrique, spectrophotométrique), soit la détermination de sa *masse moléculaire* ou de ses *caractéristiques géométriques* (méthode par diffusion en particulier).

3. SÉDIMENTATION, ULTRACENTRIFUGATION

Les molécules protéiques en solution sont soumises à l'action de diverses forces (agitation moléculaire, poussée hydrostatique, force de pesanteur) dont la résultante détermine un mouvement de *diffusion* freiné par frottement sur les molécules de solvant. Les molécules protéiques étant volumineuses, les frottements sont importants et la *diffusion libre s'opère très lentement.* Les constantes de diffusion des protéines sont environ cent fois plus faibles que celles des ions et des petites molécules organiques.

Pour la même raison, il est possible de soumettre les molécules protéiques à une force centrifuge importante qui va engendrer un déplacement assez rapide pour être mesurable. D'après la formule :

$$f = m\omega^2 l$$

dans laquelle m est la masse de la molécule, ω la vitesse angulaire du centrifugeur et l la distance de la molécule à l'axe de rotation (fig. 4.21), cette force dépend des caractéristiques du centrifugeur utilisé (ω et l).

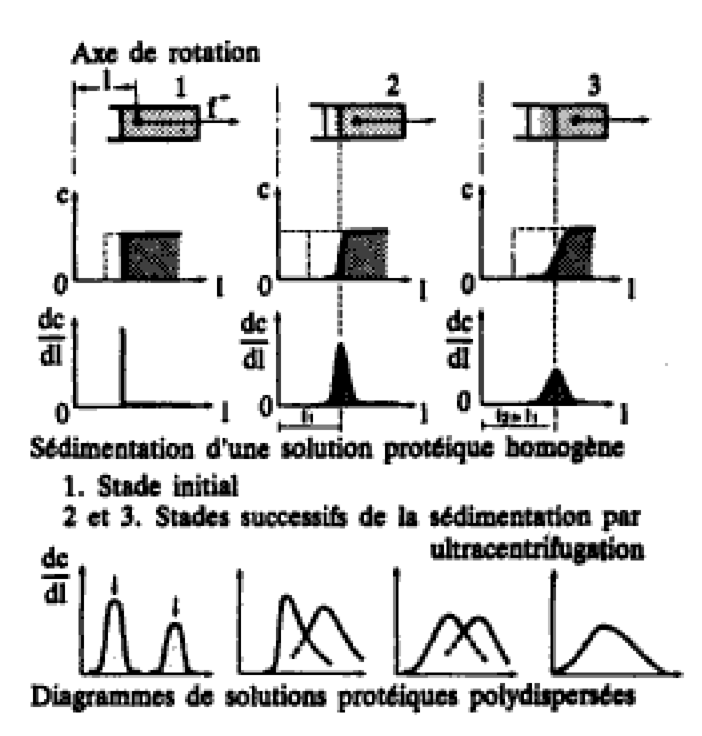


Figure 4.21 Sédimentation des protéines.

Svedberg a mis au point une technique de centrifugation à grande vitesse ou *ultracentrifugation* qui à l'aide d'un appareillage complexe (ultracentrifugeur) permet d'atteindre et de dépasser 60 000 tr/min, ce qui correspond, pour l'appareil, à un champ de gravitation de 300 000 à 700 000 G en moyenne. Les molécules ainsi mises en mouvement vont généralement sédimenter, par suite de leur densité qui est supérieure à celle du solvant et la sédimentation peut être suivie en mesurant les variations d'indice de réfraction de la solution (qui sont liées aux variations de concentration) ou les variations d'absorbance à 280 nm, en fonction de la distance l à l'axe de rotation.

— *Dans le cas d'une solution homogène, monodispersée,* les molécules sédimentent sensiblement avec la même vitesse et il y a formation d'une seule *frontière,* c'est-à-dire d'une zone où la concentration en protéine varie de 0 à une valeur c_0 [courbes $c = f(l)$]. Plutôt que la frontière elle-même, le système optique d'enregistrement permet de suivre le déplacement du *pic* correspondant aux variations de la dérivée dc/dl encore appelée *gradient de concentration.* La vitesse de sédimentation qui n'est autre que la vitesse de déplacement du pic est donc égale à :

$$\frac{l_2 - l_1}{t_2 - t_1} \quad \text{ou} \quad \frac{dl}{dt} \text{ à la limite}$$

et dépend du champ de gravitation.

La *constante de sédimentation s,* qui représente la vitesse de sédimentation dans un champ unité,

$$s = \frac{1}{\omega^2 l} \cdot \frac{dl}{dt}$$

est au contraire une caractéristique de la protéine. On l'évalue en *unités Svedberg* S après l'avoir ramenée à des conditions définies (sédimentation dans l'eau, à 20 °C). Une unité Svedberg S = 10^{-23}cm/s/unité de champ. Pour la plupart des protéines, s est compris entre 1 et 200 unités.

Ex. : sérum-albumine de cheval : $s_{20} = 4{,}55$ S, uréase : $s_{20} = 18{,}65$ S. La connaissance de s et celle de la constante de diffusion de la protéine dans le même solvant permettent de calculer sa masse moléculaire.

Une autre méthode, plus laborieuse, mais ne nécessitant ni la mesure de la constante de diffusion, ni des accélérations aussi fortes, consiste à déterminer les conditions dans lesquelles il y a *équilibre de sédimentation,* la sédimentation compensant la diffusion. La technique n'est applicable qu'à une protéine pure, mais permet également le calcul de la masse moléculaire.

D'autres méthodes enfin opèrent dans un milieu possédant un gradient de densité soit préparé préalablement (centrifugation de zone) soit réalisé en cours de centrifugation (centrifugation isopycnique). Ces techniques sont surtout utilisées pour l'étude des acides nucléiques.

— Si la *solution est hétérogène, polydispersée* (mélange de protéines ou agrégats macromoléculaires d'une protéine), le diagramme d'ultracentrifugation est

plus complexe. Le nombre et les positions des pics dépendent des valeurs des différentes constantes de sédimentation, chaque type de particule sédimentant plus ou moins rapidement (fig. 4.21).

L'ultracentrifugation permet donc de déterminer les *masses moléculaires* vraies ou celles des agrégats, c'est en outre un *critère de pureté* des protéines dont les résultats peuvent être différents de ceux déduits de la solubilité.

4. PROPRIÉTÉS OSMOTIQUES. PHÉNOMÈNE DE DONNAN

Nous venons de voir que les protéines diffusent lentement dans un milieu libre, par contre elles ne traversent pas les membranes perméables (collodion, cellophane). *Les protéines ne sont pas ultrafiltrables, ni dialysables,* d'où la possibilité de les purifier en éliminant les petites molécules et les ions par ultrafiltration, dialyse ou électrodialyse.

Si une solution protéique est placée dans un osmomètre (sac de collodion ou osmomètre Dutrochet) et que celui-ci soit plongé dans le solvant, qui est, en général, une solution saline diluée, tamponnée, on observe quand l'équilibre entre la solution et le solvant est réalisé une différence de niveau h entre les liquides.

Les solutions protéiques développent donc une *pression osmotique,* qui est faible mais permanente par suite de l'absence de diffusion au travers de la membrane. Cette pression osmotique des protéines ou *pression oncotique* intervient dans les échanges cellulaires et dans ceux des secteurs hydriques de l'organisme.

En général, il n'y a pas concordance entre la valeur mesurée expérimentalement π et la valeur calculée d'après la loi de Van t'Hoff π'. Si différentes mesures sont effectuées, à température constante, en faisant varier uniquement la concentration c de la solution protéique, on constate alors que la courbe $\pi = f(c)$ n'est pas une droite comme le laisse supposer la formule

$$\pi' = RT \cdot \frac{c}{M} = kc$$

mais un segment de parabole (fig. 4.22).

La proportionnalité n'est réalisée que lorsque c tend vers zéro, aussi pour déterminer la masse moléculaire M d'une protéine est-il nécessaire de faire plusieurs mesures à différentes concentrations puis d'extrapoler à concentration nulle.

Quelle est l'origine de cette anomalie ? Pour le comprendre, nous allons étudier les principaux facteurs qui influencent la pression osmotique.

• **Le pH.** — Expérimentalement, la relation $\pi' = kc$ n'est vérifiée pour un large intervalle de concentration que si le pH du solvant est voisin du pH_i de la protéine. Donc la dissociation intervient, ce qui nous amène à considérer la répartition des ions du solvant.

• **La répartition des ions : le phénomène de Donnan.** — Supposons, comme c'est le cas général dans la matière vivante, qu'au pH de la solution, la protéine porte un excès de charges négatives et se comporte comme un anion symbolisé P^-. Si le solvant ne contient que les ions Na^+ et Cl^-, on établit, et l'expérience confirme, qu'à l'équilibre, leurs concentrations à l'intérieur et à l'extérieur de

l'osmomètre vérifient la *relation de Donnan* :

$$\frac{[Na^+]_{ext}}{[Na^+]_{int}} = \frac{[Cl^-]_{int}}{[Cl^-]_{ext}} \quad \text{ou} \quad [Na^+]_{ext} \cdot [Cl^-]_{ext} = [Na^+]_{int} \cdot [Cl^-]_{int} .$$

Le produit des concentrations des ions diffusibles est le même de part et d'autre de la membrane mais l'anion protéique déplace une quantité équivalente d'ions Na^+ vers l'intérieur. Il en résulte que les ions Na^+ sont plus abondants dans l'osmomètre qu'à l'extérieur (au contraire les ions Cl^- sont en nombre plus élevé dans le solvant) et que le *nombre d'ions diffusibles est plus grand du côté de l'ion non diffusible* (fig. 4.22).

Cette relation, qui peut être généralisée au cas de plusieurs anions et cations diffusibles, a des conséquences d'autant plus importantes que la solution protéique est plus concentrée, la protéine plus chargée et la solution d'électrolyte plus diluée.

La pression osmotique mesurée expérimentalement π représente donc la somme de la *pression osmotique propre* à la protéine π_1 uniquement fonction de sa concentration et de sa masse moléculaire, et de la *pression osmotique* π_2 *due à l'excès d'ions diffusibles* dans l'osmomètre (il faudrait également tenir compte d'un facteur dû à l'hydratation de la protéine). Dans la technique de détermination de la masse moléculaire par osmométrie, qui est une méthode classique pour les protéines, il est

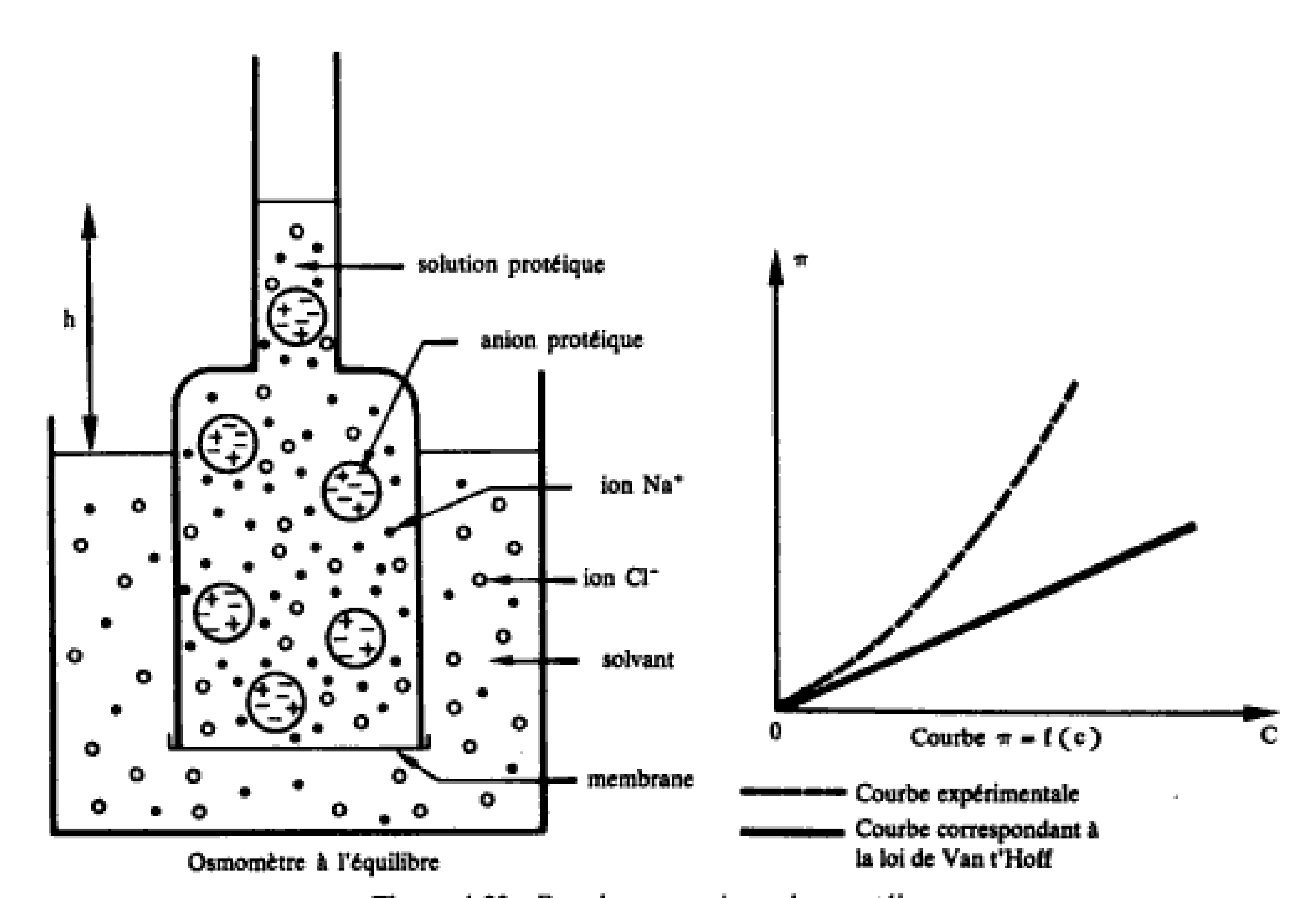


Figure 4.22 Pression osmotique des protéines.

donc nécessaire de corriger la mesure, sauf si elle est effectuée au point isoélectrique, d'une valeur π_2 qui peut être calculée.

Enfin cette différence de concentrations des anions et des cations diffusibles de chaque côté de la membrane fait naître une *différence de potentiel* entre ses deux faces.

II. PROPRIÉTÉS CHIMIQUES

Les propriétés chimiques sont celles des groupements fonctionnels portés par les résidus d'amino-acides mais ceux-ci étant intégrés dans une grosse molécule leurs comportements sont modifiés d'une façon plus ou moins spécifique au point d'être à l'occasion totalement masqués. Ces modifications permettent parfois de préciser la structure de la protéine et d'établir une relation avec l'activité biochimique (cas des enzymes).

A. Amphotérie des protéines

Toute protéine possède un nombre important de *groupements ionisables,* à caractère acide ou basique, forts ou faibles, caractérisés par leurs pK. ***Ex.*** :

— groupements carboxyliques : terminal de la chaîne peptidique et latéraux des résidus aspartyl et glutamyl ;

— fonctions amine primaire : terminale de la chaîne et latérales de la lysine ;

— fonctions phénol, thiol, etc., des résidus tyrosyl, cystéyl, etc.

Selon le pH de la solution par rapport à leur pK, ces groupements seront plus ou moins ionisés et la protéine se comportera soit comme un anion (excès de charges négatives) soit comme un cation dans le cas contraire.

Par définition, le ***point iso-ionique*** correspond au pH de la solution pour lequel le nombre de groupements chargés positivement est égal à celui des groupements chargés négativement. Soit encore, le pH pour lequel le nombre de protons cédés par les groupements acides dissociés est égal au nombre de protons combinés avec les groupements basiques.

Pour les protéines, contrairement aux amino-acides, ce point iso-ionique diffère légèrement du ***point isoélectrique,*** pour lequel il n'y a aucune migration dans un champ électrique. La différence provient du fait que la solution protéique renferme des sels minéraux, donc des ions qui, en se fixant sur les molécules de protéine, en modifient la charge nette moyenne. Par pH_i ou pI nous confondrons iso-ionique et isoélectrique, ce qui est légitime.

L'ionisation et l'amphotérie des protéines ont de nombreuses conséquences.

• **Le pH_i est généralement inférieur à 7 ;** dans la matière vivante les protéines se comportent plutôt comme des anions.

• La **courbe de titration** d'une protéine est complexe, elle présente plusieurs zones de neutralisation correspondant à des groupements de pK différents (fig. 4.23). Pratiquée sur la protéine native, la titration permet l'identification et l'estimation du nombre des fonctions ionisées. Il est également possible d'en suivre les variations au cours de la dénaturation ou de l'activité de la protéine.

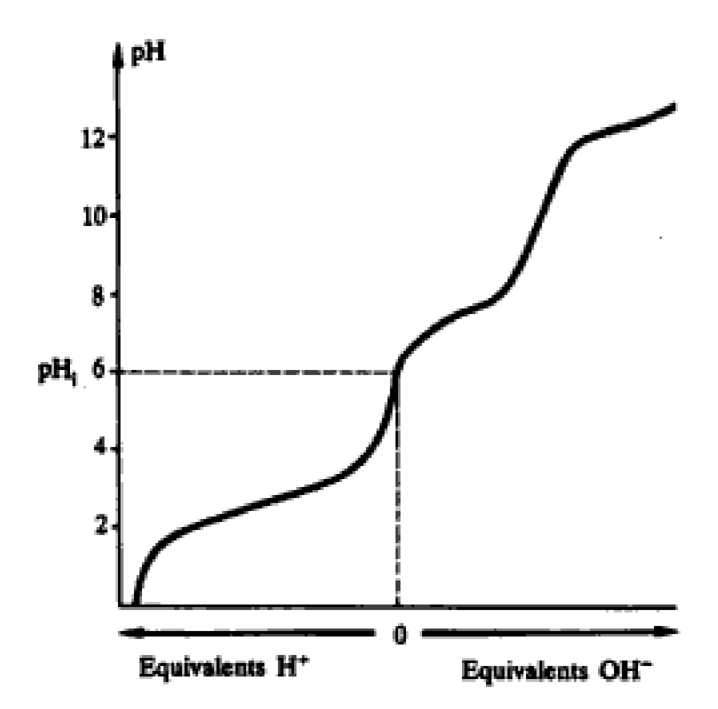


Figure 4.23 Courbe de titration d'une protéine.

• Enfin, on peut fractionner les mélanges protéiques par *électrophorèse* en opérant à un pH convenable.

B. Réactions des protéines

Les principales réactions chimiques sont analogues à celles décrites à propos des chaînes latérales des amino-acides (p. 73). Les unes sont utiles pour l'*étude structurale* des molécules (combinaison avec le dinitrofluorobenzène, oxydation et réduction des groupes thiol ou disulfure, désamination par l'acide nitreux), d'autres permettent de préparer des *dérivés* intéressants (le formol permet non seulement la formol-titration, mais aussi la fixation des coupes de tissus, le tannage, la préparation des anatoxines ; les dérivés azoconjugués protéiques ont permis de définir la notion d'*haptène*).

A ces réactions s'ajoutent la rupture des liaisons peptidiques par *hydrolyse* chimique ou enzymatique et les classiques réactions de coloration que nous allons rappeler.

C. Réactions colorées des protéines

• Les **réactions chimiques** sont selon les cas :
— caractéristiques de la liaison peptidique : réaction du biuret (p. 77) ;
— caractéristiques d'un groupe d'acides aminés : acides aminés aromatiques pour la réaction xanthoprotéique à l'acide nitrique, amino-acides soufrés dans la réaction à l'acétate de plomb en milieu alcalin ;
— spécifiques d'un acide aminé : la tyrosine pour la réaction de Millon (solution de mercure dans l'acide nitrique concentré), le tryptophane pour la réaction d'Adamkiewicz (méthanal en présence d'acide sulfurique) ou d'Ehrlich (*p*-diméthyl-amino-benzaldéhyde sulfurique), etc.
• Les **réactions de coloration par adsorption d'un colorant** (bleu de bromophénol, rouge Ponceau, amido-schwarz, vert de lissamine) sont utilisées pour la révélation des protéines séparées par chromatographie ou par électrophorèse sur support.

III. PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

Presque toutes les protéines, de même que les polypeptides de masse moléculaire suffisante, présentent un *pouvoir antigénique ;* introduites dans un organisme étranger, elles déterminent la production d'anticorps cellulaires ou circulants. Certaines sont de plus douées de *propriétés toxiques* (exotoxines bactériennes), *enzymatiques, hormonales* ou *anticorps.*

IV. MÉTHODES D'ANALYSE DES PROTÉINES

Il peut s'agir principalement, ou bien de préparer une protéine en vue de l'étude de sa structure, de ses propriétés ou de son utilisation, auquel cas il faudra veiller à éviter toute dénaturation, ou bien encore de doser une fraction protéique plus ou moins bien définie.

A. La préparation

Elle comprend plusieurs étapes :
— l'*extraction* à partir de matériel frais ou d'un extrait délipidé (poudre acétonique ou éthérée) basée sur les propriétés de solubilité ;

— la *purification et le fractionnement* qui consistent à éliminer les petites molécules (par ultrafiltration, dialyse et électrodialyse) et à séparer les macromolécules (par électrophorèse, chromatographie ou précipitations fractionnées). La protéine purifiée peut être alors cristallisée ou déshydratée par lyophilisation ;

— la *vérification de la pureté* et de l'intégrité de la protéine. Elle fait appel à des critères très variés : physiologiques (détermination de l'activité hormonale), immunologiques (réactions antigène-anticorps), biochimiques (activité enzymatique spécifique), physico-chimiques (cristallisation, courbe de solubilité, ultracentrifugation, électrophorèse).

B. Les méthodes de dosage

Elles sont physiques, chimiques ou immunologiques.

Parmi les **méthodes physiques** on peut retenir :

— *le dosage par pesée.* — Après insolubilisation quantitative des protéines, le précipité lavé est séché puis pesé. C'est une méthode de référence ne nécessitant pas d'étalonnage ;

— *le dosage réfractométrique.* — Méthode rapide basée sur la variation de l'indice de réfraction en fonction de la concentration ;

— *les dosages par spectrophotométrie* dans l'ultraviolet ne peuvent s'appliquer que si l'échantillon à doser et l'étalon sont identiques. Ces méthodes ne permettent pas le dosage de mélanges de protéines (comme un sérum par exemple).

Parmi les **méthodes chimiques :**

— *le dosage de l'azote* selon Kjeldahl consiste à minéraliser l'azote protéique à l'état d'ammoniac dosable par acidimétrie ou colorimétrie. Ses nombreuses adaptations augmentent les possibilités de cette technique toujours en faveur ;

— *les dosages colorimétriques* après réaction colorée (méthode au biuret par exemple) ou après fixation d'un colorant sont d'un usage courant au laboratoire clinique.

Une méthode physique ou chimique, appliquée à un mélange complexe, réalise le dosage de toutes les protéines, en revanche, une méthode immunologique, fondée sur une réaction antigène-anticorps, permet le dosage spécifique d'une espèce protéique donnée. Citons, parmi les **méthodes immunologiques :**

— celles qui mettent en jeu la réaction antigène-anticorps en milieu gélifié : l'immunodiffusion radiale et l'électro-immunoquantification. Ces deux méthodes ont en commun la migration de la protéine à doser au sein d'un gel d'agar dans lequel a été incorporé l'anticorps correspondant ; la migration s'effectue par diffusion dans le cas de l'immuno-diffusion radiale, par déplacement électrophorétique dans le cas de l'immuno-électroquantification ;

— celles qui, en milieu liquide, sont fondées sur la mesure du trouble formé par le complexe antigène (à doser)-anticorps, telle l'immunonéphélométrie à laser.

Classification des protéines

I. LES HOLOPROTÉINES

Les holoprotéines ou protéines sont difficiles à classer, à la fois à cause de leur nombre, de leur diversité et de nos connaissances imparfaites. Les différents groupes de la classification actuelle tiennent compte de la structure, mais surtout de la solubilité, de la répartition dans le monde vivant et de techniques analytiques.

A. Les protéines globulaires

• Les **protamines** sont en fait des *polypeptides* puisque leur masse moléculaire est inférieure à 5 000 dal. Présentes dans les noyaux des cellules de sperme de poisson (laitance), les protamines sont associées à des acides nucléiques. Solubles dans l'eau et les acides, mais insolubles dans les alcalis, elles sont incoagulables par la chaleur. La composition de ces protéines est particulière, certains amino-acides sont absents (amino-acides aromatiques, tryptophane) ou faiblement représentés (acides aspartique, glutamique, cystéine), d'autres sont très abondants (acide aminés basiques, arginine en particulier). Les protamines sont des *protéines basiques* (pH_i de l'ordre de 12).

Ex. : Salmine (laitance du saumon), clupéine (du hareng), sturine (de l'esturgeon).

• Les **histones,** de masses moléculaires plus élevées et *moins basiques* que les protamines (pH_i de l'ordre de 10), sont solubles dans l'eau et coagulables à la chaleur. Ces protéines associées à des acides nucléiques sont présentes dans les globules rouges des oiseaux, dans les leucocytes et plus généralement dans les noyaux des cellules animales.

• Les **prolamines** et les **glutélines** sont des *protéines végétales* complexes souvent mal individualisées. Les prolamines sont solubles dans l'éthanol à 70-80 %, riches en proline et acide glutamique ; la lysine et la glycine faisant parfois défaut. ***Ex.*** : Zéine du maïs, gliadine du blé, hordéine de l'orge.

Les glutélines sont solubles dans les alcalis dilués. ***Ex.*** : Gluténine du blé, édestine du chènevis.

Les protéines végétales jouent un rôle économique important pour l'alimentation animale, on appelle « protéagineux » les végétaux dont les graines sont riches en protéines : soja, fèves, pois, haricots, etc.

• Les **albumines** et les **globulines** constituent les deux groupes le plus importants. Les *albumines* en solution neutre ne précipitent que pour des concentrations en sulfate d'ammonium supérieures à 50 % de la saturation, alors que les *globulines* sont déjà totalement insolubilisées. On subdivise ces dernières en *euglobulines* insolubles dans l'eau pure mais solubles dans les solutions salines diluées et en *pseudo-globulines* solubles dans l'eau.

Les *albumines* ont une masse moléculaire généralement comprise entre 50 000 dal. et 125 000 dal., un pH_i acide, voisin de 5 ; elles sont solubles dans l'eau et cristallisent facilement. Les *globulines* ont une masse moléculaire élevée, supérieure à 150 000 dal., un pH_i moins acide, elles cristallisent plus difficilement et comme les albumines coagulent par la chaleur.

Ces deux séries de protéines ont une répartition très générale, elles sont abondantes dans le sérum (sérumalbumine, sérumglobulines) et le blanc d'œuf (ovalbumine, ovoglobuline). On les trouve également dans le lait (lactalbumine, lactoglobulines) et dans les tissus animaux ou végétaux (myoalbumine, thyréoglobuline, amandoglobuline, etc.).

L'ensemble des *protéines sériques,* dont le taux moyen chez l'homme est voisin de 70 à 80 g/l, a été subdivisé en fonction des différentes méthodes de fractionnement, en particulier des divers modes d'électrophorèse.

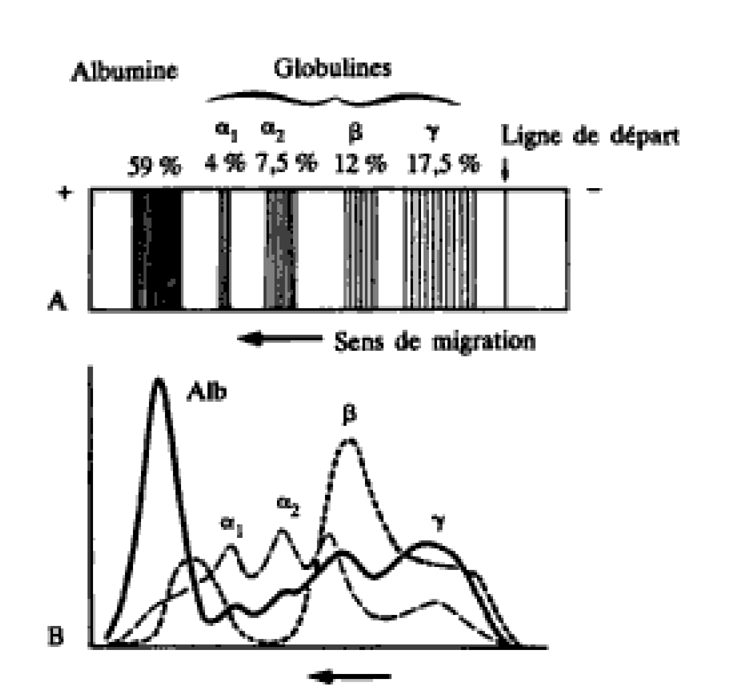


Figure 4.24 Fractionnement des protéines sériques par électrophorèse sur papier.
A. Electrophorèse sur support : électrophorégramme après coloration des protéines (pH 8,6).
B. Courbes enregistrées lors du passage de l'électrophorégramme au colorimètre :
——— après coloration des protéines (protéinogramme)
– – – – – après coloration des glucides (glucidogramme)
·········· après coloration des lipides (lipidogramme).

La *sérumalbumine* est la protéine sérique la plus mobile et la plus abondante dans l'électrophorèse à pH = 8,6. Sa molécule est ellipsoïdale (150 × 38 Å), sans doute constituée d'une seule chaîne polypeptidique et son pH_i = 4,8. La sérumalbumine a une masse moléculaire de 69 000 dal., elle cristallise assez facilement en

particulier à l'état de dérivé mercurique (mercaptalbumine) par l'intermédiaire de son groupement thiol. Dans le plasma, cette protéine intervient dans l'équilibre osmotique et dans le transport de nombreuses substances hydrosolubles ou non. La sérumalbumine est capable de fixer des anions minéraux (Cl^-, I^-, SCN^-) ou organiques (colorants comme le méthylorange, certains médicaments), des acides gras, la bilirubine, etc.

Les *sérumglobulines* constituent un ensemble complexe de protéines qui peuvent être classées :

• D'après **l'électrophorèse** sur papier (fig. 4.24) et par ordre de mobilités décroissantes en α (α_1 et α_2), β et *γ-globulines* ;

• D'après la **solubilité et la structure,** en protéines vraies ou *holoprotéines* (euglobulines et pseudoglobulines selon la solubilité aqueuse) et en hétéroprotéines (1) (*glycoprotéines* et *lipoprotéines*).

Les *lipoprotéines*, constituées d'une fraction protéique, de cholestérol libre ou estérifié et de phospholipides dont ils assurent le transport, sont répartis dans les trois fractions globuliniques. Ils sont abondants dans la fraction β (fig. 4.24) (en particulier la β_1 lipoprotéine de masse moléculaire 13 000 dal., mais sont présents également dans la fraction α_1 et presque absents de la fraction α_2 (voir p. 257, chapitre consacré aux lipides).

Les *glycoprotéines* sont réparties dans toutes les fractions α, β, γ mais les α_2-globulines en sont les plus riches. Formés par l'association d'une protéine et de glucides (galactose, mannose, glucosamine, galactosamine, acide sialique, fucose), ils renferment de nombreux constituants (prothrombine, céruléoplasmine, haptoglobine, fibrinogène plasmatique).

• D'après le **rôle physiologique.** On distingue alors :

— Les *transporteurs* : de lipides, de cholestérol, de caroténoïdes, d'hormones stéroïdes (β-lipoprotéines), de métaux (la *sidérophiline ou transferrine* qui est une β_1-globuline pour le fer, la *céruléoplasmine* qui est une α_2-globuline pour le cuivre), etc.

— Les *anticorps* ou immunoglobulines (fig. 4.25), constituant la majeure partie des γ-globulines sont les seules protéines plasmatiques à ne pas être d'origine hépatique.

— Les *isoagglutinines* responsables de la spécificité des groupes sanguins.

— Les *hormones protéiques* (antéhypophysaires), les *enzymes* sériques (phosphatases, transaminases, lipase, amylase, etc.).

— Les *facteurs de la coagulation.* — La *prothrombine,* les *facteurs accélérateurs* et le *plasminogène,* précurseur de la plasmine, enzyme lysant le caillot de fibrine.

— Le *fibrinogène* est une protéine plasmatique (3 à 4 g/l), peu soluble, de masse moléculaire 330 000 dal., dont la molécule très allongée fait transition avec les protéines fibrillaires. Cette glycoprotéine est facilement transformée en une protéine fibreuse, la *fibrine,* sous l'action de la *thrombine* en présence d'ions calcium ou sous l'action d'agents chimiques (ninhydrine).

(1) C'est à cause de leur répartition et de leur rôle physiologique que nous signalons dans cette partie, concernant les holoprotéines, ces hétéroprotéines que sont les lipoprotéines et les glycoprotéines sériques.

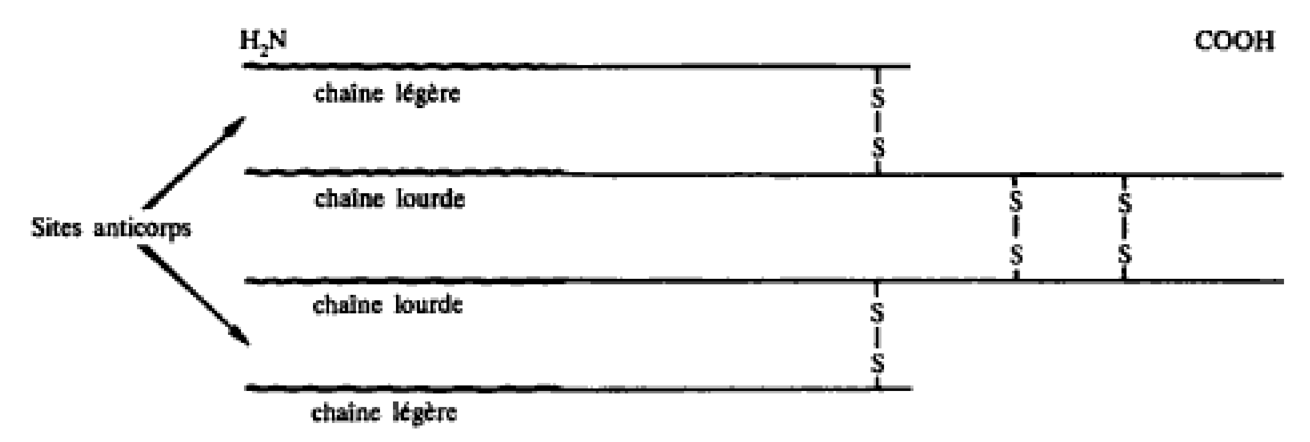


Figure 4.25 Structure schématique d'une immunoglobuline G (Ig G).

B. Les protéines fibrillaires

Ce sont les *protéines de structure* des tissus. Certaines sont solubles dans les solutions salines assez concentrées (force ionique supérieure à 0,4). ***Ex.*** : la myosine, l'actine et la tropomyosine des fibres musculaires striées. Les autres sont totalement insolubles, dépourvues de tryptophane et souvent de tyrosine : ce sont les *scléroprotéines,* assez inertes du point de vue chimique.

Ex. : la *fibroïne de la soie,* riche en glycine et alanine, à structure en feuillets plissés ;

— les *kératines,* abondantes dans les productions épidermiques (cheveux, laine, ongles, plumes), riches en soufre et à structure hélicoïdale ;

— les *collagènes,* scléroprotéines des tissus conjonctifs, cartilagineux et osseux, de structure complexe et constituées essentiellement de glycine, proline et hydroxyproline. Les collagènes se transforment par chauffage avec de l'eau à l'autoclave en gélatine ou colle d'os, d'où leur nom.

II. LES HÉTÉROPROTÉINES

Les hétéroprotéines sont classées d'après la nature de leur groupement prosthétique qui peut être :

— l'acide orthophosphorique pour les *phosphoprotéines.* Ce groupe de transition rassemble des protéines dont la seule particularité est leur teneur relativement élevée en acide phosphorique ;

— un pigment pour les *chromoprotéines,* qui sont les plus caractéristiques des hétéroprotéines ;

— un acide nucléique, un glucide, un lipide, respectivement pour les *nucléoprotéines,* les *glycoprotéines* et les *lipoprotéines,* qui représentent plutôt des associations moléculaires variées et complexes entre espèces chimiques différentes *(protéines conjuguées).*

A. Les phosphoprotéines : la caséine

Les phosphoprotéines sont abondantes dans les laits (caséines) et le jaune d'œuf (vitelline, vitellénine, phosphovitine) mais se rencontrent également dans les structures cellulaires (certaines enzymes). Nous retiendrons l'exemple des caséines, principaux constituants protéiques des laits : 80 % des protéines du lait de vache, soit environ 30 g/l, 50 % des protéines du lait de femme (5 à 7 g/l).

Les caséines diffèrent selon l'espèce considérée. De plus, pour une espèce de Mammifère donnée, le produit brut, obtenu généralement par acidification du lait écrémé, peut être fractionné en composants spécifiques par précipitation, ultracentrifugation ou électrophorèse.

Ex. : La *caséine brute* du lait de vache est composée de plusieurs espèces moléculaires : l'α-caséine, la β-caséine, la κ (kappa)-caséine et la γ-caséine.

Ces composés diffèrent les uns des autres par leurs propriétés physiques, leurs formes et leurs masses moléculaires, ils peuvent être séparés par électrophorèse et ultracentrifugation.

Dans cette étude rapide, il ne sera question que de la caséine brute, plus spécialement celle du lait de vache.

1. PROPRIÉTÉS. STRUCTURE

La caséine est une poudre blanche, amorphe, insoluble dans l'eau, les acides, l'éthanol et l'éther. Elle est soluble dans les alcalis et les carbonates alcalins en formant des caséinates dont les solutions sont visqueuses (colle de caséine). Son pH_i est voisin de 4,6.

a. Composition en acides aminés

Elle est déduite d'hydrolyses totales et fait ressortir :

— des teneurs élevées en acide glutamique, proline, leucine, lysine, mais aussi en amino-acides à fonction alcool (sérine, thréonine) et un taux très faible de cystine ;

— la présence de tous les acides aminés ordinaires, dont les amino-acides indispensables. La caséine possède une valeur alimentaire élevée, favorable au développement du jeune Mammifère, ce qui la fait utiliser dans les régimes artificiels ou en addition à certains aliments. Par ailleurs, l'emploi des *peptones de caséine*, produits d'hydrolyse partielle, pour enrichir les milieux de culture est bien connu des Bactériologistes.

Les résidus d'acides aminés constituent plusieurs chaînes peptidiques, huit selon la détermination des résidus *N* terminaux par la technique de Sanger qui permet également de constater que de nombreux groupements ε aminés de la lysine sont engagés dans la structure car ils ne réagissent pas avec le dinitrofluorobenzène.

b. Structure

Les masses moléculaires des caséines α, β et κ sont voisines de 25 kdaltons (à l'état de monomères).

La caséine κ renferme, outre de l'acide phosphorique, de faibles quantités de glucides et d'un acide sialique.

Les hydrolyses chimiques partielles et les coupures enzymatiques ont fourni des résultats intéressants sur la structure de la caséine en précisant le rôle de l'acide phosphorique. Celui-ci est présent dans la molécule sous forme de *mono-ester, de di-ester et d'ester pyrophosphorique* de la sérine et de la thréonine mais aussi sous forme de dérivé phosphorylé du groupement ε aminé de la lysine (dérivé *N*-phosphorylé).

$R{-}O{-}P(=O)(OH){-}OH$	$R{-}O{-}P(=O)(OH){-}O{-}R'$	$R{-}N(H){-}P(=O)(OH){-}O{-}R'$	$R{-}O{-}P(=O)(OH){-}O{-}P(=O)(OH){-}O{-}R'$
Mono-ester	Di-ester	Liaison N-phosphorylée	Ester pyrophosphorique

L'acide phosphorique participe donc à la structure de la caséine, en particulier à l'assemblage des chaînes polypeptidiques comme le font des ponts disulfures pour les autres protéines.

2. ETAT DE LA CASÉINE DANS LE LAIT. PRÉPARATION

Les teneurs des différentes caséines dans le lait de vache sont les suivantes :
α-caséine : 50 %
β-caséine : 30 %
κ-caséine : 15 %
γ-caséine : 5 %

Dans le lait, la caséine est à l'état de micelles macromoléculaires, combinée à des ions calcium.

Ces micelles, de forme grossièrement sphérique, seraient des associations définies des différentes espèces de caséine. Leur diamètre serait de l'ordre de 0,05 à 0,3 μm, leur masse moléculaire de $3 \cdot 10^9$ dal.

Cette forme soluble est encore appelée *caséinogène*. Sa structure paraît confirmée par la préparation à partir de caséine, de chaux et d'acide phosphorique, de *phosphocaséinates* de calcium qui en solution présentent les mêmes propriétés que le lait écrémé. Il en résulte que selon les conditions de précipitation, on peut obtenir des produits différents, du type caséinogène, fortement minéralisés, ou du type caséine pure.

Les *procédés physiques,* thermocoagulation à l'autoclave vers 130°-140 °C, relargage par les sels neutres à forte concentration, addition d'éthanol, insolubilisent la caséine par dénaturation ou déshydratation.

Les *méthodes chimiques* procèdent par acidification jusqu'au pH_i. Les acides utilisés sont minéraux (acides chlorhydrique et sulfurique) ou organiques (acides acétique et lactique) et le phénomène est rapide (addition brusque d'acide) ou lent (additions ménagées ou fermentation naturelle du lait). La caséine précipitée est d'autant plus dépolymérisée et d'autant moins minéralisée que l'acidification est plus lente.

Si, dans les conditions naturelles, le lait « tourne », c'est par suite d'un abaissement de pH dû à la fermentation lactique du lactose. Les méthodes de stérilisation et de pasteurisation retardent ce phénomène par destruction des germes responsables. Industriellement, ces procédés chimiques appliqués au lait écrémé permettent la préparation des caséines acides ; caséines acétiques, sulfuriques ou lactiques, ces dernières étant les seules utilisées pour l'alimentation.

Un *processus biologique* provoque également l'insolubilisation de la caséine. La *présure* ou *chymosine* ou encore lab-ferment est une enzyme sécrétée par les glandes gastriques des Mammifères jeunes. Extraite de la caillette de veau, la présure, en présence d'*ions calcium* coagule la caséine. Il y a prise en masse du lait suivie de rétraction du caillé. Cette transformation correspond à une protéolyse partielle suivie d'une polymérisation.

La caséine κ subit une coupure sous l'influence de la présure libérant une caséinoglycopeptide d'une part et une paracaséine κ d'autre part :

$$\text{caséine } \kappa \xrightarrow[\text{présure}]{} \text{glycopeptide} + \text{paracaséine } \kappa$$

L'attaque protéolytique de la caséine κ déstabilise les micelles de caséine, qui, sous l'influence de l'ion calcium, polymérisent en formant le caillé.

Ce mode de préparation est utilisé dans la fabrication de certains fromages.

B. Les chromoprotéines : l'hémoglobine

Les hémoglobines sont des chromoprotéines rouges à ***rôle respiratoire*** portées par les hématies des Vertébrés et présentes également chez certains Invertébrés ainsi que dans les nodosités des racines de Légumineuses *(leghémoglobine)* où elles interviendraient en créant les conditions d'anaérobiose permettant la fixation d'azote.

Comme pour les caséines, les méthodes modernes d'analyse ont mis en évidence la *multiplicité des hémoglobines* qui se traduit par des différences plus ou moins importantes selon :

— l'espèce animale. ***Ex.*** : hémoglobine humaine, hémoglobine du cheval ;

— l'origine tissulaire. ***Ex.*** : hémoglobine sanguine, hémoglobine musculaire ou myoglobine ;

— l'âge. ***Ex.*** : hémoglobines fœtales, hémoglobine adulte ;

— certains états pathologiques. ***Ex.*** : hémoglobine falciforme *S*, hémoglobine anémiante *C*, hémoglobine *G*-San José, etc.

Sauf spécification contraire, c'est de l'hémoglobine humaine adulte normale symbolisée **Hb *A*** dont il sera question par la suite.

1. PRÉPARATION. PROPRIÉTÉS PHYSIQUES

A partir de sang défibriné ou rendu incoagulable, les hématies sont isolées par centrifugation et lavées plusieurs fois par une solution isotonique de chlorure de

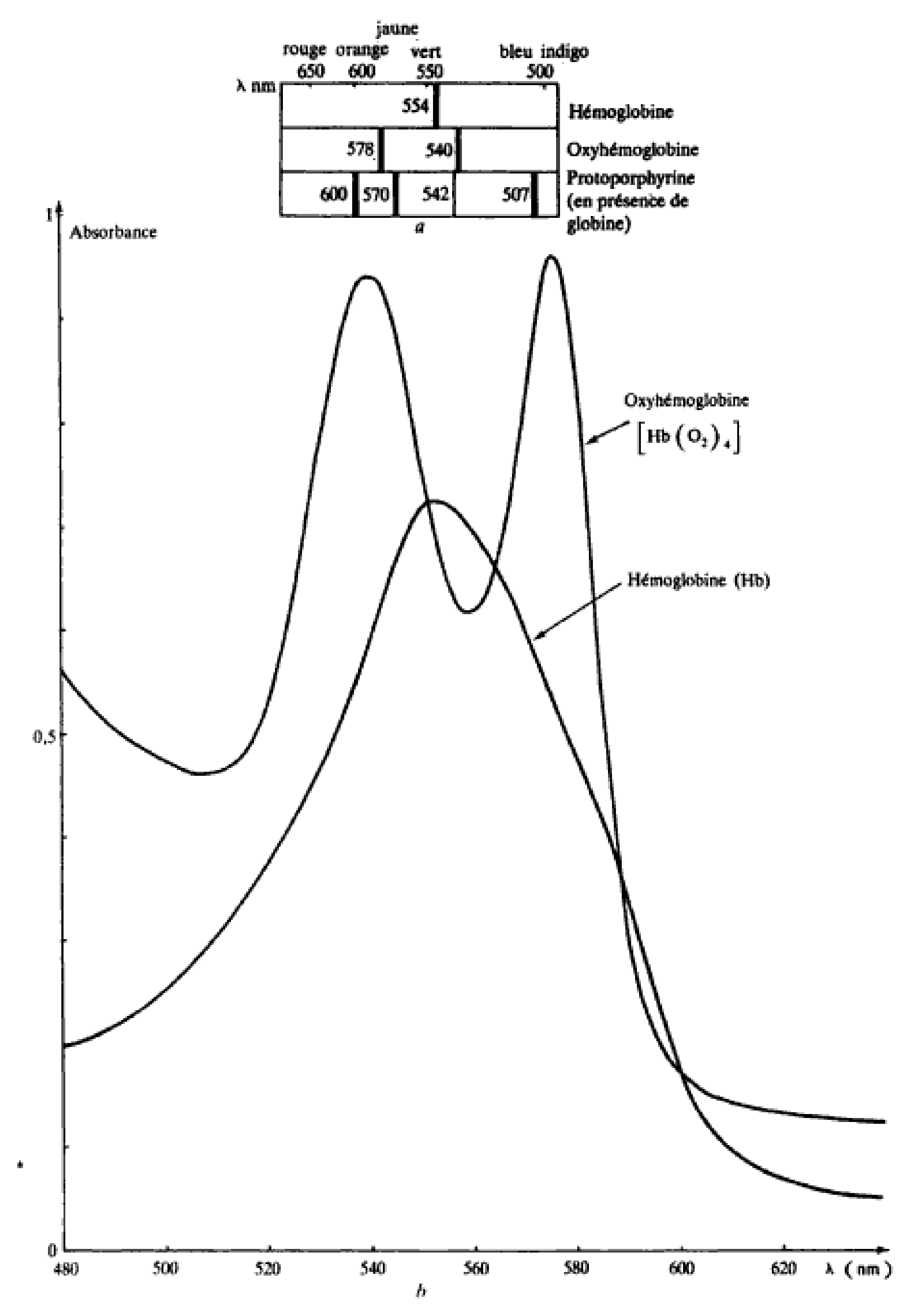


Figure 4.26 Spectres d'absorption :
a) Position des principales bandes. *b*) Spectres d'absorption tracés au spectrophotomètre.

sodium. On provoque l'hémolyse et les débris cellulaires ou *stromas* sont éliminés par une nouvelle centrifugation.

La solution aqueuse apparaît colorée en rouge sombre s'il s'agit d'*hémoglobine,* en rouge vif s'il s'agit d'*oxyhémoglobine* comme c'est le cas le plus fréquent. Les différences de coloration sont liées à des modifications du spectre d'absorption faciles à mettre en évidence à l'aide d'un spectroscope (fig. 4.26*a*) ou d'un spectrophotomètre (fig. 4.26*b*).

La solution maintenue à basse température en présence d'éthanol ou de sels neutres laisse déposer des cristaux hydratés, généralement d'oxyhémoglobine, qui peuvent être purifiés par dissolution et recristallisation. L'aptitude à la cristallisation varie beaucoup selon l'espèce animale ; l'oxyhémoglobine du cheval cristallise facilement, celle du lapin difficilement.

La forme des cristaux obtenus est assez spécifique, compte tenu des conditions opératoires (fig. 4.27).



Figure 4.27 Cristaux d'oxyhémoglobine.

2. COMPOSITION. STRUCTURE

Une solution aqueuse d'hémoglobine traitée à froid par un large excès d'acétone chlorhydrique se sépare en deux phases, un précipité blanc résultant de la dénaturation de la *fraction protéique* et une solution colorée en brun correspondant au *groupement prosthétique* d'ailleurs modifié.

a. La fraction protéique : les globines

La fraction protéique est la ***partie spécifique*** des hémoglobines, il y a autant de globines que d'hémoglobines. Elle en représente les 96 %.

• Les **globines des myoglobines** sont constituées par *une seule chaîne peptidique* dont la structure primaire, secondaire et tertiaire est parfois complètement connue (fig. 4.15). Ces protéines riches en histidine, lysine et acide glutamique ont des masses moléculaires voisines de 17 000 dal. et des pH_i de l'ordre de 7.

• Les **globines des hémoglobines** sont des tétramères résultant de l'assemblage spécifique et symétrique de *quatre chaînes peptidiques* ou *protomères* (p. 100). Cette structure quaternaire peut être dissociée dans certaines conditions (variations de pH, urée) en sous-unités, dimères et protomères.

Les globines des hémoglobines diffèrent les unes des autres d'une part, par la nature des chaînes peptidiques symbolisées α, β, γ d'après leurs compositions et, d'autre part, par l'assemblage de ces monomères.

Ex. : la globine de l'hémoglobine *A*, constituée de deux chaînes α de

141 résidus et de deux chaînes β de 146 résidus dont les séquences sont connues est représentée Hb *A* $\alpha_2^A\ \beta_2^A$,

— celle de l'hémoglobine *H*, constituée de quatre chaînes β identiques aux précédentes s'écrit, Hb *H* β_4^A,

— celle de l'hémoglobine *C*, pour laquelle il y a seulement remplacement de l'acide glutamique (sixième résidu de la chaîne β) par de la lysine, est symbolisée Hb *C* $\alpha_2^A\ \beta_2^{6\ Lys}$.

b. Le groupement prosthétique : l'hème

Ce composé qui représente 4 % des hémoglobines est identique dans tous les cas.

• *L'hème contient du* **fer,** qu'il est facile de mettre en évidence après incinération ou minéralisation de l'hémoglobine. L'analyse élémentaire révèle une teneur en fer de 0,34 % ce qui correspond à *un atome de fer par molécule de myoglobine* et à *quatre atomes par molécule d'hémoglobine* (masse moléculaire voisine de 64 500 dal.). Cet élément ne peut être mis directement en évidence, il n'est pas à l'état ionique, mais *complexé.*

• *L'hème renferme une molécule complexe* : **la protoporphyrine.**

— Les *porphyrines* sont des dérivés de substitution d'un noyau tétrapyrrolique, synthétisé mais non isolé des produits naturels, la *porphine* (fig. 4.28) constituée par l'assemblage de quatre noyaux *pyrrole* reliés par des radicaux méthène =CH—.

La majeure partie des porphyrines naturelles sont des *porphines octosubstituées* au niveau des sommets β des noyaux pyrroliques. D'après la nature des substituants qui sont en nombre limité (groupements méthyl, éthyl, vinyl, acide propanoïque) on distingue plusieurs séries de porphyrines (*protoporphyrines, mésoporphyrines, étioporphyrines, coproporphyrines, phylloporphyrines,* etc.). Pour une série donnée, la position des substituants sur le noyau est à l'origine d'isoméries. Les isomères sont repérés par un chiffre romain.

Ex. : La porphyrine de l'hème appartient à la série des protoporphyrines dans laquelle elle représente l'isomère IX ou *acide porphine*-1, 3, 5, 8-*tétraméthyl*-2, 4-*divinyl*-6, 7-*dipropionique* communément nommé *protoporphyrine* (fig. 4.28).

— Les *porphyrines sont très répandues* dans la nature, en particulier la protoporphyrine (hémoglobines, cytochromes, certaines enzymes) et les porphyrines des chlorophylles.

Elles se rencontrent surtout à l'état combiné, les formes libres étant rares et de répartition aléatoire.

Ce sont des composés bien cristallisés, généralement insolubles dans l'eau en milieu neutre, mais solubles dans l'acide acétique, le chloroforme et surtout la pyridine. Les solutions sont d'un *rouge* plus ou moins violacé et présentent un spectre d'absorption caractéristique (fig. 4.26) dans le visible. Le spectre ultraviolet ne comprend qu'une seule bande très forte voisine de 400 nm et les spectres infrarouges sont intéressants pour les études structurales.

Les porphyrines, inactives sur la lumière polarisée, possèdent une *fluorescence rouge* très vive qui permet de les déceler à l'état de traces.

Figure 4.28 Structure de la protoporphyrine.

La généralité de la répartition des porphyrines, qui traduit une *apparition précoce et une permanence au cours de l'évolution* des êtres vivants, est sans doute liée, comme le sont les propriétés, à la *structure électronique* particulière de ces molécules.

Le noyau porphine, totalement conjugué, renferme un *pool d'électrons* π délocalisés, ce qui se traduit par des conséquences importantes pour :

— la *stabilité.* — Le noyau porphine est très stable, son énergie de résonance élevée (160 kcal/mole) soit environ 6 kcal par électron π (soit 25 kJ) ;

— la *forme.* — Tous les atomes sont coplanaires, la molécule est plane et rigide ;

— les *propriétés.* — Les spectres d'absorption, donc la couleur, sont liés à cette conjugaison ;

— la *répartition des charges.* — Il existe des charges à la périphérie de la molécule, les carbones β des noyaux pyrroles sont chargés négativement (excès d'électrons), les carbones des ponts méthéniques positivement (défaut d'électrons). La molécule a la possibilité de recevoir ou de donner des électrons, toute modification électronique locale influençant l'ensemble de la répartition.

Certaines de ces propriétés sont modifiées lors de la substitution du noyau par des radicaux ce qui confère de nouvelles possibilités aux porphyrines.

— Parmi les propriétés chimiques il nous faut citer le *caractère basique* des porphyrines. Ces bases azotées forment des sels avec les acides forts en particulier avec les hydracides. Les chlorhydrates de porphyrines résultent de la combinaison de deux molécules d'acide chlorhydrique avec une molécule porphyrinique.

La propriété de loin la plus importante est la possibilité de former avec certains cations (magnésium, zinc, fer, cuivre, cobalt, etc.) des *complexes chélatés très stables,*

les *métalloporphyrines*. Ces composés, facilement préparés par mélange d'un sel avec une solution de porphyrine, sont bien cristallisés, intensément colorés, insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques tels que le chloroforme ou la pyridine.

• **Structure de l'hème (*).** — Le groupement prosthétique des hémoglobines, l'*hème*, est le *complexe ferreux de la protoporphyrine* ; c'est une *ferroporphyrine*. Dans ce complexe l'atome de fer remplace les deux atomes centraux d'hydrogène et est également lié aux quatre atomes d'azote (fig. 4.29).

Diverses méthodes d'étude ont permis de préciser la structure électronique de l'hème. Dans ce complexe qui fait intervenir les orbites externes du fer, le cation se comporte comme accepteur d'électrons dans son interaction avec la protoporphyrine qui représente le *ligand* du complexe.

L'ion ferreux forme un *complexe hexavalent* (coordination 6) dont la structure est octaédrique. En plus des quatre coordinations avec la porphyrine il s'établit deux liaisons dans une direction perpendiculaire au plan du ligand, une au-dessus, l'autre au-dessous, soit avec des composés azotés basiques soit avec la globine (fig. 4.29). Le complexe est de *type ionique* car l'atome de fer possède quatre électrons célibataires dans ses orbitales 3 *d*, pour cette raison l'ion central est écrit comme l'ion libre Fe^{2+}.

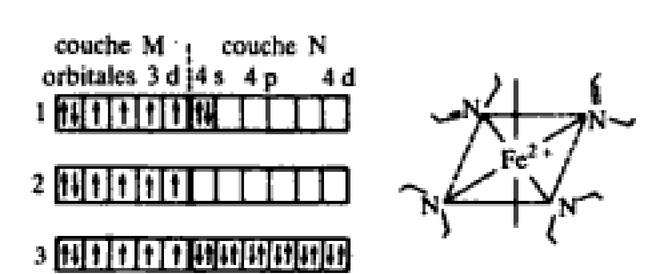


Figure 4.29 Le complexe fer-porphyrine. *A gauche* : structures électroniques des couches périphériques du fer (1), de l'ion ferreux (2), du fer dans le complexe de coordination 6 ; *à droite* : structure octaédrique du complexe.

• **L'hème et l'hématine.** — L'hème séparé de la globine est peu stable et facilement décomposé ou oxydé en son dérivé ferrique l'*hématine*, beaucoup plus stable.

C'est l'hématine, dérivé coloré en brun, qui passe en solution lorsqu'on traite l'hémoglobine par l'acétone chlorhydrique, il en est de même en présence d'un oxydant comme le ferricyanure de potassium.

L'hémoglobine traitée à chaud par un mélange d'acide acétique et de chlorure de sodium est transformée, après dénaturation de la globine, en *chlorhydrate d'hématine* ou *hémine* qui cristallise de façon caractéristique. Ces cristaux, dits de Teichmann, permettent d'identifier des taches suspectes de sang. La réaction est utilisée en médecine légale.

Le passage hème, hématine est réversible ; sous l'influence de réducteurs (hydrosulfite de sodium) l'hématine est réduite en hème. Celui-ci forme avec les bases azotées comme l'ammoniaque, la pyridine et les amines primaires des combinaisons assez stables, les *hémochromogènes*, caractérisés par des spectres

(*) L'hème est encore appelé protohème pour rappeler la nature de la porphyrine.

d'absorption intenses en rapport avec leur pouvoir colorant considérable. La formation d'hémochromogènes peut également être mise à profit pour la recherche et la caractérisation de traces de sang.

c. La liaison globine-hème. Structure de l'hémoglobine

Dans la *myoglobine de Cachalot*, la globine par suite des repliements de sa structure tertiaire (fig. 4.15) présente une encoche dans laquelle est logé le groupement hème. De forme plane, l'hème est disposé presque perpendiculairement à la surface de la molécule protéique (fig. 4.30 et 4.31), les groupements acides propanoïques étant superficiels, le reste du complexe enfoncé dans la globine qui l'entoure en le découvrant toutefois.

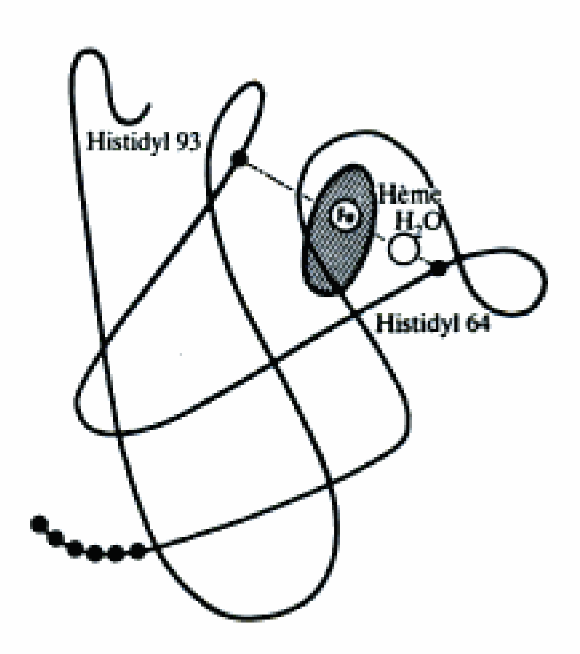


Figure 4.30 Schéma de la structure de la myoglobine. (Comparer à la carte électronique — fig. 4.31 — les rapports globine-hème).

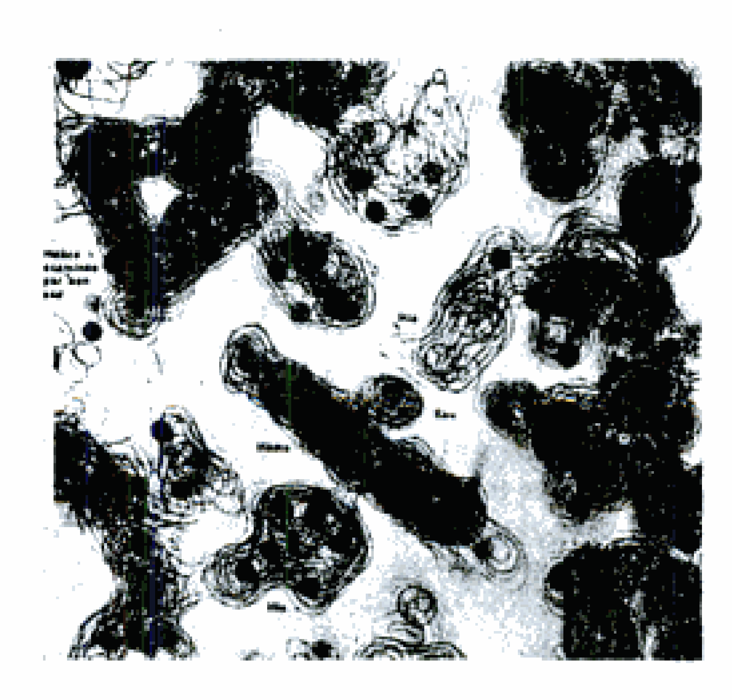


Figure 4.31 Myoglobine : carte électronique représentant l'hème et ses liaisons avec la globine ainsi que les fragments d'hélice α de la globine (d'après Kendrew).

L'hème est lié à la globine, par sa cinquième coordination avec le résidu histidyl n° 93 et par sa sixième coordination indirectement avec le résidu histidyl n° 64, par l'intermédiaire d'une molécule d'eau. D'où le schéma :

$$\text{Histidyl 93} \gt N:\!-\!Fe^{2+}(N)_4 - H_2O - \text{Histidyl 64}$$

La synthèse de cette liaison est possible par addition d'hème à une globine non dénaturée.

Pour les *hémoglobines* chaque protomère est lié de manière analogue à un groupement hème, toujours par l'intermédiaire de résidus histidyl (leurs numéros sont légèrement différents) et les quatre protomères assemblés dans la structure quaternaire forment la molécule sensiblement tétraédrique qui renferme donc quatre hèmes.

3. PROPRIÉTÉS CHIMIQUES

Le rôle biologique essentiel de l'hémoglobine est lié à sa possibilité de se combiner réversiblement avec certains gaz dont l'oxygène.

a. Combinaison avec les gaz

• **Combinaison avec l'oxygène.** — Une solution d'hémoglobine agitée en présence d'air ou d'oxygène prend une coloration rouge vif due à sa transformation en *oxyhémoglobine*. Inversement l'addition d'un réducteur permet de reformer l'hémoglobine qui est parfois qualifiée pour cette raison d'hémoglobine réduite ou *désoxyhémoglobine*. Spectroscopiquement la réduction de l'oxyhémoglobine est accompagnée de la fusion de ses deux bandes d'absorption en une bande unique, *la bande de réduction de Stokes* (fig. 4.26). Au cours de cette transformation, 1 g d'hémoglobine peut échanger 1,34 cm^3 d'oxygène, soit *une molécule d'oxygène pour un atome de fer,* d'où l'équation :

$$Hb + 4\,O_2 \rightleftarrows Hb\left(O_2\right)_4 \qquad (1)$$

Il s'agit d'une oxygénation de l'hémoglobine par fixation d'une molécule d'oxygène sur la sixième coordination du fer. Ce n'est pas une oxydation, le *fer demeurant à l'état ferreux*. Cependant, au cours de la réaction, il intervient un changement dans la répartition des électrons, modifiant la structure du complexe et ses propriétés magnétiques.

D'après l'équilibre (1) ci-dessus, la formation et la dissociation de l'oxyhémoglobine sont sous la dépendance de la pression d'oxygène. Les courbes de saturation de la myoglobine et de l'hémoglobine ont des allures différentes. La première est hyperbolique, la seconde est une sigmoïde qui traduit l'accroissement des échanges d'oxygène pour une variation donnée de sa pression, au moins dans la zone physiologiquement utilisée (fig. 4.32).

libération de protons fait de l'oxyhémoglobine un composé plus acide que l'hémoglobine (pH_i respectifs 6,7 et 6,81 et variations des pK). Ce phénomène a pour conséquence un cycle de fixation et de libération du gaz carbonique au cours des échanges d'oxygène. L'effet Bohr rend compte de l'action des ions H^+ et du CO_2 sur la fixation de l'oxygène O_2 ; un abaissement du pH provoque la libération O_2 à partir de $Hb(O_2)_4$ et réciproquement.

— Des analyses cristallographiques aux rayons X ont permis à Perutz et son équipe de mettre en évidence des modifications de la conformation moléculaire. Le passage $Hb(O_2)_4 \rightarrow Hb$ s'accompagne d'une *déformation de la molécule* : les deux chaînes α demeurent dans les mêmes positions symétriques mais les deux chaînes β subissent une translation, sans modification de l'axe de symétrie, qui les éloigne l'une de l'autre. Le déplacement, appelé *transition allostérique*, éloigne les deux atomes de fer des chaînes β de 0,7 nm, distance considérable par rapport aux dimensions moléculaires qui sont de l'ordre de 5 à 6 nm. L'oxygénation provoque le mouvement inverse.

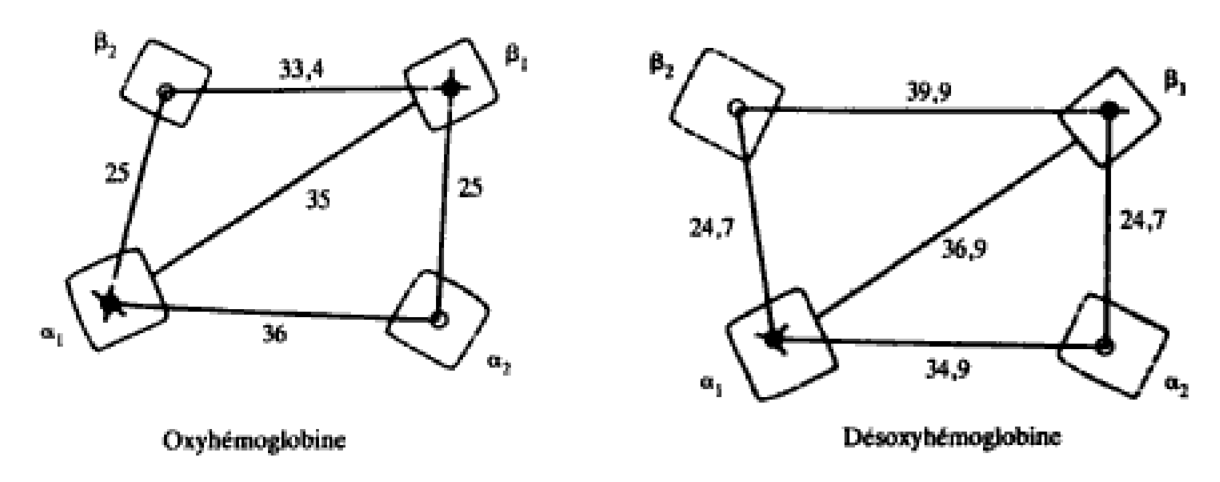


Figure 4.33 Déplacements relatifs des chaînes α et β de l'hémoglobine lors des échanges d'oxygène (distance en Å).

On voit s'établir avec l'hémoglobine un *rapport entre la conformation moléculaire liée à la structure quaternaire et l'état fonctionnel.* Il en résulte une possibilité d'*autorégulation* qui sera développée à propos des enzymes sous le terme d'allostérie.

Pour en terminer avec l'oxyhémoglobine il nous faut signaler que sa formation est légèrement exothermique, l'équilibre est donc influencé par les variations de température. L'action du pH, dont l'élévation favorise la formation d'oxyhémoglobine, est en rapport avec les remaniements structuraux et l'effet Bohr décrits précédemment.

• **Combinaison avec l'oxyde de carbone.** — Cette combinaison est identique à celle avec l'oxygène, le composé obtenu $Hb(CO)_4$ appelé *carboxyhémoglobine* présente la même coloration et un spectre voisin de celui de l'oxyhémoglobine. Il est cependant possible de les différencier par action d'un réducteur qui dans le cas de la carboxyhémoglobine ne fera pas apparaître la bande de réduction.

La vitesse de combinaison est plus lente qu'avec l'oxygène mais la *stabilité beaucoup plus forte*. La réaction

$$Hb(O_2)_4 + 4\,CO \rightleftarrows Hb(CO)_4 + 4\,O_2$$

a une constante d'équilibre d'environ 200 (150 à 500 selon les hémoglobines). La dissociation est difficile, elle ne peut être réalisée que par de fortes pressions d'oxygène, d'où l'*oxygénothérapie* pratiquée dans l'intoxication oxycarbonée.

La grande affinité de l'hémoglobine pour l'oxyde de carbone est responsable de la facilité des intoxications (des traces suffisent), ainsi que d'une part de leur gravité et de la difficulté d'y remédier.

• **Combinaison avec d'autres gaz.** — De manière analogue, l'hémoglobine se combine avec d'autres gaz : *acide cyanhydrique* (cyanhémoglobine), *monoxyde d'azote* NO, *carbylamines,* etc. La combinaison avec le *sulfure d'hydrogène* HS_2, la sulfhémoglobine, de couleur vert olive, n'a peut-être pas exactement la même structure.

La *combinaison avec le dioxyde de carbone* ou *carbhémoglobine* est de nature totalement différente et de moindre importance physiologique. Il s'agit cette fois d'une propriété de la partie protéique dans laquelle n'intervient pas directement l'hème. Le dioxyde de carbone et les ions hydrogénocarbonate peuvent se fixer sur les groupements basiques de la globine ; la courbe traduisant la fixation en fonction de la pression du gaz carbonique est simple, hyperbolique. Les liaisons carbaminées (R—NH—COOH) ou ioniques formées sont influencées, ainsi que le taux d'hydrogénocarbonate des hématies, par la transformation $Hb \rightleftarrows Hb(O_2)_4$ du fait de l'échange de protons qui l'accompagne (effet Bohr). Ces composés, en association avec les ions phosphates et potassium, participent au maintien de l'équilibre acido-basique globulaire.

b. Oxydation de l'hémoglobine, la méthémoglobine

En présence d'oxydants doux qui ne dénaturent pas la globine, comme le ferricyanure, l'hémoglobine est oxydée en *méthémoglobine* par suite de la transformation du fer divalent en *fer trivalent,* l'hème devenant l'hématine. Cette combinaison de la globine et de l'hématine, brune en milieu acide (bande d'absorption dans le rouge) et rouge en milieu alcalin, n'est plus apte à se combiner avec les gaz. De l'oxyhémoglobine traitée par le ferricyanure s'oxyde en méthémoglobine et libère l'oxygène fixé, ce qui permet d'en déterminer le volume. L'incapacité pour la méthémoglobine de s'unir à l'oxygène, donc d'assurer un transport normal de ce gaz, est à l'origine d'intoxications graves ayant pour causes, soit l'absorption de médicaments ou de toxiques (nitrites, chlorates, aniline, phénacétine, etc.), soit une auto-intoxication intestinale, soit enfin une anomalie du métabolisme des hématies ou méthémoglobinémie congénitale.

Le passage inverse méthémoglobine → hémoglobine, qui peut se réaliser *in vitro* sous l'influence de réducteurs comme l'acide ascorbique ou le bleu de méthylène, a lieu également dans les hématies normales. C'est un système d'oxydoréduction que l'on peut schématiser, en ne considérant qu'un seul groupe-

a. Propriétés

Les principales propriétés de ces pigments sont utilisées pour leur recherche, leur identification ou leur dosage.

A l'exception des leucodérivés du type bilanne, ce sont des composés à *caractère basique,* salifiables par les acides, malgré la présence de leurs carboxyles eux-mêmes salifiables et estérifiables. En particulier, ils donnent lieu à la formation de sels complexes, fluorescents, avec le zinc.

Les pigments biliaires peuvent être oxydés ou réduits. L'*oxydation* qui se fait au contact de l'air est favorisée par certains oxydants comme l'iode, le chlorure ferrique, l'eau oxygénée, l'acide nitrique (réaction de Gmelin).

Certains peuvent copuler avec les sels de diazonium pour donner des *colorants azoïques* rouge violacé. L'un des réactifs les plus utilisés est le sel de diazonium de l'acide sulfanilique $\left(HSO_3—C_6H_4—N{=}N—Cl\right)$ obtenu extemporanément par mélange d'une solution chlorhydrique d'acide sulfanilique à une solution aqueuse de nitrite de sodium. Cette réaction de diazotation est encore appelée réaction d'Hijmans Van den Bergh.

La condensation avec le paradiméthylamino-benzaldéhyde (réaction d'Erlich) aboutissant à un dérivé rouge violacé permet la recherche et le dosage des chromogènes urinaires et fécaux.

b. Principaux pigments

La ***bilirubine*** est le principal constituant des pigments biliaires. On la trouve en quantité notable dans la bile et les calculs biliaires des Mammifères, à l'état de traces dans le sang (moins de 10 mg/l de sérum) et de façon pathologique dans l'urine des ictériques.

C'est un corps cristallisable, de couleur orangée, soluble dans le chloroforme, les alcalis en formant des sels (bilirubinates), mais insoluble dans l'eau en milieu neutre ou acide. Sa recherche dans l'urine se fait par oxydation en biliverdine et pigments voisins, son dosage dans le sérum est généralement basé sur la réaction d'Hijmans Van den Bergh. Il faut alors distinguer :

— la *bilirubine libre,* normalement seule présente, insoluble dans l'eau mais transportée par la sérumalbumine. Elle ne donne lieu à la réaction colorée qu'en présence d'un solvant d'extraction (alcool, chloroforme, benzène, caféine dans une solution de benzoate de sodium) et pour cette raison on parle encore de *bilirubine indirecte ;*

— la *bilirubine conjuguée,* combinée à l'*acide glucuronique* (p. 167) (glucuro-conjugaison hépatique), très soluble dans l'eau. Cette forme qui peut être dosée directement *(bilirubine directe)* se rencontre dans la bile, dans le plasma lors de certains ictères d'où elle peut alors passer dans l'urine.

La ***biliverdine,*** vert foncé, présente dans la bile de certains animaux, résulte d'une oxydation de la bilirubine. Elle ne donne pas de diazoréaction, ni de réaction d'Erlich.

Les ***chromogènes,*** l'***urobiline,*** la ***stercobiline.*** Dans l'intestin, sous l'influence de la flore, les pigments biliaires subissent une série de transformations au cours desquelles se forment des chromogènes du type bilanne (mésobilirubinogène,

levures. Ils se rencontrent séparément chez les Invertébrés, les végétaux supérieurs et les bactéries ;

— des ***cytochromes*** à répartition plus limitée — désignés par les lettres *e*, *f*, *h*, etc., ou les symboles b_1, b_2, b_4, c_2, etc., par suite des analogies spectrales avec les cytochromes *a*, *b*, *c* — sont fréquents chez les micro-organismes.

La structure de ces chromoprotéines est comparable à celle de l'hémoglobine. Chaque cytochrome comporte une fraction protéique spécifique, de masse moléculaire assez faible et dont l'étude des structures est en plein développement, et un groupement prosthétique résultant de l'association du fer et d'une porphyrine. Toutefois il faut noter un certain nombre de différences :

— la porphyrine est tantôt la protoporphyrine (cytochromes *b* et *c*), tantôt une autre porphyrine (cytochrome *a*) ;

— le complexe fer-porphyrine est du type covalent, la distribution des orbitales est différente. Le complexe ferreux peut facilement céder un électron et le complexe ferrique a un pouvoir accepteur d'électrons prononcé : les cytochromes sont des ***transporteurs d'électrons :***

$$\text{Cyt Fe}^{2+} \rightleftarrows \text{Cyt Fe}^{3+} + e^-$$

Forme réduite *Forme oxydée*

Le passage des électrons peut se faire d'un cytochrome à un autre et la cytochrome-oxydase $(a + a_3)$ peut assurer le transfert à l'oxygène.

— La liaison entre la protéine et le groupement prosthétique est différente de celle de l'hémoglobine, les résidus cystéine peuvent participer à des liaisons thioéthers avec les chaînes latérales de la porphyrine comme cela paraît être le cas dans le cytochrome *c*.

Les cytochromes, fixés plus ou moins solidement sur les mitochondries, quand elles existent, peuvent se combiner avec divers composés (CO, CN^-, antimycine A, etc.) qui se comportent comme des inhibiteurs vis-à-vis de certains d'entre eux en bloquant le transfert d'électrons.

• **Les enzymes héminiques** comprennent :

Les ***catalases,*** présentent dans les tissus animaux, les bactéries aérobies et en quantité beaucoup plus faible dans les tissus végétaux, catalysent la décomposition des peroxydes :

$$2\,H_2O_2 \rightarrow 2\,H_2O + O_2$$

Leur groupement prosthétique est le *dérivé ferrique de la protoporphyrine, l'**hématine.***

Les ***peroxydases,*** essentiellement végétales ou bactériennes à l'exception de la *lactoperoxydase* du lait et de la *myéloperoxydase* des leucocytes, catalysent l'oxydation d'un substrat à partir d'un peroxyde selon l'équation :

$$RH_2 + H_2O_2 \rightarrow R + 2\,H_2O$$

Le groupement prosthétique est également un *dérivé ferrique de porphyrine.*

— **Non respiratoires.** — Nous retiendrons dans ce groupe les ***chloroplastines,*** chromoprotéines résultant de l'assemblage d'une *protéine* et d'une *chlorophylle* qui représente le groupement prosthétique.

Les chlorophylles sont des complexes magnésiens de porphyrines, dans lesquels le noyau tétrapyrrolique porte en plus des huit radicaux fixés aux sommets des noyaux pyrrole, un neuvième radical au niveau de l'un des ponts méthéniques. De plus l'un des groupes propanoïques est estérifié par le *phytol,* alcool primaire en C_{20}. Les diverses chlorophylles (chlorophylles *a, b,* bactériochlorophylles) diffèrent les unes des autres par la nature des radicaux substituants.

En association à des phospholipides, des caroténoïdes et des enzymes, les chloroplastines constituent les *chloroplastes,* inclusions cytoplasmiques à ultrastructure complexe, *sièges de la photosynthèse.*

D'autres pigments végétaux, les ***phycobilines,*** apparentés aux pigments biliaires (absence de métal, quatre noyaux pyrrole enchaînés linéairement), peuvent également figurer ici. On les rencontre dans les Algues rouges et les Algues bleues et ils sont classés selon leur teinte en *phycocyanines* et *phycoérythrines.*

b. Les chromoprotéines non porphyriniques

— **Respiratoires.** — Ce sont les ***hémérythrines,*** pigments bruns de certains vers *(Géphyriens)* et les ***hémocyanines,*** bleues à l'état oxygéné et contenues dans l'hémolymphe des Arthropodes et des Mollusques. Les premières renferment du fer, les secondes du cuivre.

— **Non respiratoires.** — Ces chromoprotéines très variées comprennent :

des ***métalloprotéines*** qui sont généralement des formes de transport ou de mise en réserve : du fer (*ferritine* de la rate et du foie, *sidérophiline* plasmatique), du cuivre (*hépatocupréine* du foie de porc, *céruléoplasmine*). A cet ensemble se rattachent, également, un certain nombre d'*enzymes* (phénoloxydases, acide ascorbique-oxydase, etc.) ;

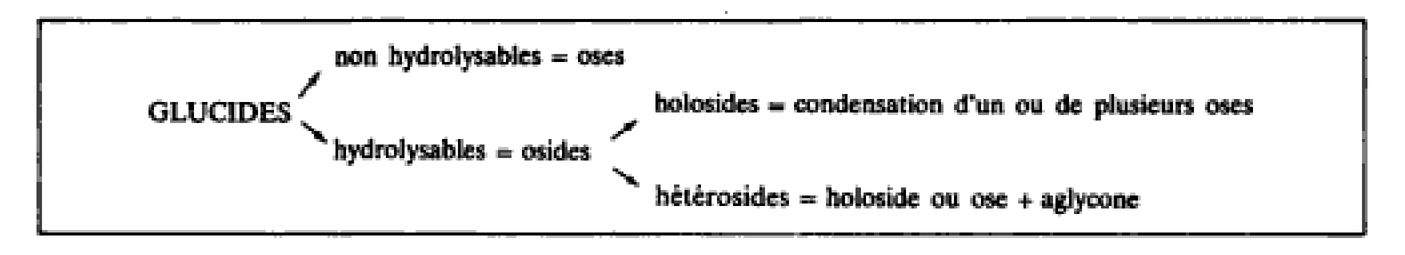
des ***caroténoprotéines,*** associations d'une protéine et d'un caroténoïde (p. 245). ***Ex.*** : le pourpre rétinien (p. 245) ;

des ***flavoprotéines*** parmi lesquelles sont classées des enzymes essentielles du métabolisme cellulaire.

Les trois autres groupes d'hétéroprotéines : ***nucléoprotéines, glycoprotéines*** et ***lipoprotéines,*** représentant plutôt des associations moléculaires, seront étudiés à propos de chacune des espèces biochimiques constituant le « *groupement prosthétique* ».

5
Les glucides

Les glucides sont des composés typiquement ternaires (C, H, O), universellement répandus dans la matière vivante. Ils représentent environ 5 % du poids sec des animaux et 70 % du poids sec des végétaux. Certains sont extraits dans la fraction acido-soluble, les sucres en particulier, d'autres sont des composés macromoléculaires. Les glucides se répartissent en deux groupes selon leur comportement en milieu faiblement acide et à chaud. Les sucres simples ou *oses* comme le glucose ne sont pas modifiés dans ces conditions ; ils ne sont pas hydrolysables. Les glucides complexes ou *osides* comme le saccharose ou l'amidon sont hydrolysables et libèrent un nombre variable de molécules d'un ou plusieurs oses. Ce groupe est subdivisé en *holosides* qui ne libèrent que des oses et en *hétérosides* qui libèrent en plus une fraction non glucidique appelée *aglycone*. D'où le tableau :



Structure et propriétés des oses

Par sa répartition dans le monde vivant, à l'état libre ou combiné, par son rôle biologique et par son importance dans la structure de nombreux glucides, le ***glucose*** peut être considéré comme le représentant *type de ce groupe*. C'est lui que nous présenterons et qui nous servira le plus souvent d'exemple.

Le glucose pur se présente sous forme d'une poudre blanche à saveur sucrée. Il cristallise en fines aiguilles n'ayant pas, dans les conditions ordinaires, de point de fusion net. Chauffé, le glucose suinte, fond vers 150 °C mais commence aussitôt à se décomposer : il caramélise.

Très soluble dans l'eau, même à la température ambiante, le glucose est également soluble dans le méthanol et la pyridine mais insoluble dans l'éther et les

solvants aromatiques. Les solutions aqueuses concentrées sont sirupeuses, de saveur sucrée bien que le pouvoir sucrant soit nettement inférieur à celui du saccharose.

Le glucose est *actif sur la lumière polarisée,* sa forme naturelle est *dextrogyre,* d'où l'appellation de *dextrose* qui lui est parfois donnée. Son pouvoir rotatoire spécifique est de + 52°5. Si l'on détermine ce pouvoir rotatoire à partir d'une solution fraîchement préparée, on constate que pour une même concentration sa valeur, bien que toujours positive, dépend des conditions de cristallisation et varie avec le temps, en général en décroissant, pour se stabiliser au bout de quelques heures. On donne à ce phénomène le nom de *mutarotation* (ou *multiple rotation*) et l'étude de la structure va permettre d'en expliquer l'origine (p. 162).

I. FORMULE DÉVELOPPÉE LINÉAIRE

A. Formule moléculaire

L'analyse élémentaire et la détermination de la masse molaire permettent d'attribuer au glucose la formule brute :

$$\boxed{C_6H_{12}O_6\,.}$$

La présence de six atomes de carbone dans la molécule fait classer cet ose dans le groupe des *hexoses*.

Pour le glucose, et pour de nombreux autres glucides comme le saccharose $C_{12}H_{22}O_{11}$, l'amidon $(C_6H_{10}O_5)$ n, etc., les éléments H et O sont dans le même rapport que dans la molécule d'eau, d'où la formule générale $Cn(H_2O)$ p et l'ancienne appellation d'hydrates de carbone qui doit être abandonnée (1). En effet, certains composés qui correspondent à cette formule générale ne sont pas des glucides (méthanal CH_2O, acide lactique $C_3H_6O_3$), et certains glucides ne répondent pas à cette formule, le désoxyribose $C_5H_{10}O_4$ par exemple. Enfin le terme d'hydrate de carbone peut prêter à confusion quant à l'origine ou à la structure des glucides dans laquelle les éléments H et O ne se trouvent pas sous la forme de molécules d'eau.

A partir de cette formule brute, il faut envisager maintenant la structure moléculaire en relation avec les propriétés chimiques.

(1) Il n'en est pas de même dans la littérature étrangère, ainsi le terme de « carbohydrates » est d'un emploi général dans les ouvrages anglais et américains.

B. Formule semi-développée

— La réduction du glucose par l'acide iodhydrique en présence de phosphore conduit à un mélange de dérivés de substitution iodés correspondant à l'hexane normal. Les six atomes de carbone de la molécule sont donc enchaînés linéairement, sans ramification.

— L'estérification totale du glucose par l'anhydride acétique en présence de pyridine (acétylation pyridinée) aboutit à des penta-acétates. Il est donc logique d'admettre la présence de cinq groupements hydroxyles —OH appartenant à des fonctions alcools. Compte tenu de l'enchaînement linéaire des six atomes de carbone, deux solutions sont à envisager :

• présence d'une fonction alcool primaire et de quatre fonctions alcools secondaires soit :

$$CH_2OH—(CHOH)_4—CX$$

• présence de deux fonctions alcools primaires et de trois fonctions alcools secondaires soit, sans préjuger de la position des fonctions :

$$CH_2OH—(CHOH)_3—CX'—CH_2OH$$

La comparaison de ces formules avec la formule moléculaire montre que X = OH et X' = O. La détermination de la sixième fonction (aldéhyde ou cétone) permet de choisir entre ces deux possibilités.

— L'oxydation ménagée du glucose par le brome ou l'iode, à la température ambiante et en milieu faiblement alcalin, conduit au sel d'un acide alcool : l'acide gluconique

$$CH_2OH—(CHOH)_4—CO_2^- Na^+$$

Gluconate de sodium

Cette oxydation qui est facile et qui conduit à un seul acide, sans rupture de la chaîne carbonée prouve que la sixième fonction est une fonction aldéhyde.

Le glucose est donc un hexose aldéhydique ou *aldohexose* de formule :

$$CH_2OH—(CHOH)_4—CHO$$

ou

ε	δ	γ	β	α	
CH_2OH—	CHOH—	CHOH—	CHOH—	CHOH—	CHO
6	5	4	3	2	1

L'autre solution X' = 0, représentant une fonction cétone, se rencontre également dans les glucides naturels. Elle correspond à un cétohexose, le *fructose*.

Pour repérer les différents atomes de carbone de cette formule, on a convenu de les numéroter dans la molécule en débutant par celui qui porte la fonction

aldéhyde (carbone le plus oxydé). Un autre moyen consiste à repérer ces atomes par les premières lettres de l'alphabet grec en partant de celui qui suit la fonction caractéristique. D'où l'équivalence $2 = \alpha$, $3 = \beta$, etc.

— La formule semi-développée ci-dessous met en évidence la présence, dans la molécule de glucose d'atomes de « carbone asymétrique », d'où l'existence d'un pouvoir rotatoire. Les quatre carbones asymétriques, n° 2, 3, 4 et 5 posent des problèmes d'isomérie et de plus, si dans la formule en projection ces atomes sont représentés alignés, la configuration réelle peut sa réaliser de plusieurs façons.

Configurations du glucose en perspective (H et OH des carbones asymétriques n'ont pas été représentés). Le carbone 1 est le carbone aldéhydique, le carbone 6 porte la fonction alcool primaire CH_2OH.

C. Formule développée

— La présence des quatre carbones asymétriques permet de prévoir d'après les règles de l'isomérie optique la possibilité de $2^4 = 16$ aldohexoses isomères optiquement actifs. Ils sont tous connus, les uns sont des produits naturels et les autres ont été obtenus par synthèse (p. 141). Il est facile de les représenter en réalisant tous les arrangements possibles pour les hydroxyles des carbones asymétriques. Les formules I, II et III ci-dessous ne correspondent qu'à trois de ces possibilités.

L glucose	D glucose	D galactose
CHO	CHO	CHO
HO—C—H	H—C—OH	H—C—OH
H—C—OH	HO—C—H	HO—C—H
HO—C—H	H—C—OH	HO—C—H
HO—C—H	H—C—OH	H—C—OH
CH_2OH	CH_2OH	CH_2OH

— Des méthodes chimiques permettent de passer d'un ose à *n* atomes de carbone soit à son homologue supérieur, soit à son homologue inférieur. Nous en retiendrons deux exemples.

• *Action de l'acide cyanhydrique.* — L'acide cyanhydrique s'additionne sur la fonction aldéhyde pour former un nitrile alcool ou cyanhydrine. Par hydrolyse, il est possible de passer à l'amide, puis à l'acide et de là par réduction à l'aldéhyde, c'est-à-dire à un nouvel aldose possédant un atome de carbone de plus.

$$\begin{array}{ccccccccc}
 & & \mathrm{CN} & & \mathrm{CONH_2} & & \mathrm{COOH} & & 1'\ \mathrm{CHO} \\
1\ \mathrm{CHO} & & \mathrm{CHOH} & & \mathrm{CHOH} & & \mathrm{CHOH} & & 2'\ \mathrm{CHOH} \\
2\ \mathrm{CHOH} & \xrightarrow{+\,\mathrm{HCN}} & \mathrm{CHOH} & \xrightarrow{+\,\mathrm{H_2O}} & \mathrm{CHOH} & \xrightarrow{+\,\mathrm{H_2O}} & \mathrm{CHOH} & \xrightarrow{\text{réduction}} & 3'\ \mathrm{CHOH} \\
R & & R & & R & & R & & R \\
\text{Aldose} & & \text{Cyanhydrine} & & \text{Amide} & & \text{Acide} & & \text{Aldose } (n+1) \\
n\ \text{carbones} & & & & & & & & \text{carbones}
\end{array}$$

En fait, partant d'un aldose, on obtient un mélange, la synthèse n'étant pas stéréospécifique. Les deux isomères diffèrent seulement par le carbone n° 2′, par suite de l'apparition d'une nouvelle fonction alcool secondaire, ils sont dits *épimères*. Cette synthèse constitue la *méthode de Fischer-Kiliani.*

• *Action de l'hydroxylamine* (*méthode de dégradation de Wöhl*). — Par condensation avec l'hydroxylamine, la fonction aldéhyde passe à l'état d'oxime de laquelle on peut faire dériver la cyanhydrine puis, en présence d'oxyde d'argent, un aldose à $(n-1)$ carbones.

$$\begin{array}{ccccccc}
\mathrm{CHO} & & \mathrm{CHNOH} & & \mathrm{CN} & & \\
\mathrm{CHOH} & \xrightarrow{\mathrm{H_2NOH}} & \mathrm{CHOH} & \xrightarrow{-\,\mathrm{H_2O}} & \mathrm{CHOH} & \xrightarrow{\mathrm{Ag_2O}} & \mathrm{HCN} + \mathrm{CHO} \\
R & & R & & R & & R \\
\text{Aldose} & & \text{Oxime} & & \text{Cyanhydrine} & & \text{Aldose } (n-1) \\
n\ \text{carbones} & & & & & & \text{carbones}
\end{array}$$

Si la configuration d'un aldose à *n* carbones est connue, on peut donc en faire dériver deux aldoses épimères à $(n+1)$ carbones et inversement on peut identifier deux épimères au fait qu'ils fournissent le même homologue inférieur. Il devient alors possible de procéder par récurrence.

Partant du *D* glycéraldéhyde (triose) la synthèse chimique fournit deux tétroses selon le schéma :

$$\begin{array}{ccccccc}
 & & \mathrm{CHO} & & \mathrm{CHO} & & \mathrm{CHO} \\
\mathrm{CHO} & & \mathrm{CHOH} & & \mathrm{H{-}C{-}OH} & & \mathrm{HO{-}C{-}H} \\
\mathrm{H{-}C{-}OH} & \rightarrow & \mathrm{H{-}C{-}OH} & = & \mathrm{H{-}C{-}OH} & + & \mathrm{H{-}C{-}OH} \\
\mathrm{CH_2OH} & & \mathrm{CH_2OH} & & \mathrm{CH_2OH} & & \mathrm{CH_2OH} \\
\text{D glycéraldéhyde} & & \text{Mélange} & & \text{Tétrose A} & & \text{Tétrose B}
\end{array}$$

Chaque épimère étant isolé, il est facile de déterminer son pouvoir rotatoire spécifique, il reste alors à établir la correspondance pouvoir rotatoire-configuration (OH cis en *A* ou OH trans en *B*).

— Certaines réactions des aldoses font intervenir la *configuration de deux hydroxyles successifs* (ou vicinaux), les propriétés des dérivés obtenus variant selon qu'ils sont cis ou trans, la réaction étant elle-même plus ou moins facile selon le cas.

Ex. : L'estérification par l'acide borique est plus facile avec le dérivé cis.

$$\begin{matrix} H-\overset{|}{C}-OH \\ | \\ H-\underset{|}{C}-OH \end{matrix} + H_3BO_3 \rightleftarrows \begin{matrix} H-\overset{|}{C}-O \\ | \\ H-\underset{|}{C}-O \end{matrix} \!\!> B-OH + 2\,H_2O$$

Il est donc possible d'établir la configuràtion moléculaire et de la relier au pouvoir rotatoire. Dans l'emploi choisi, le tétrose *A* a été identifié à l'*érythose lévogyre,* le tétrose *B* au *thréose dextrogyre.* On pourrait procéder par analogie pour les homologues supérieurs et pour des dérivés du *L* glycéraldéhyde, d'où les séries :

$$\left.\begin{matrix} D \text{ glycéraldéhyde} \rightarrow 2 \text{ tétroses} \rightarrow 4 \text{ pentoses} \rightarrow 8 \text{ hexoses} \\ \\ \text{L glycéraldéhyde} \rightarrow 2 \text{ tétroses} \rightarrow 4 \text{ pentoses} \rightarrow 8 \text{ hexoses} \end{matrix}\right\} 16 \text{ hexoses}$$

D'après ce mécanisme, il ressort que, dans chacune des séries, l'hydroxyle fixé sur l'avant-dernier atome de carbone apparaîtra en projection à droite si l'ose dérive du *D* glycéraldéhyde, à gauche si l'ose dérive du *L* glycéraldéhyde. Dans le premier cas, le sucre appartient à la *série D,* dans le second à la *série L.* Ces *données sont conventionnelles* et n'ont aucune relation avec le pouvoir rotatoire, sauf pour le glycéraldéhyde (les deux trétoses ci-dessus appartiennent à la série *D*, l'un est dextrogyre, l'autre lévogyre).

Parmi les 16 aldohexoses isomères, 8 appartiennent à la série *D*, 8 à la série *L*. A chaque isomère *D* correspond son antipode optique *L* dont la formule est symétrique par rapport à un plan. Les deux antipodes optiques ont les mêmes propriétés, d'où le même nom, mais leurs pouvoirs rotatoires spécifiques sont opposés.

Le glucose naturel est le *D*(+) glucose .

Pour résumer, nous dirons que les *aldoses* sont les oses dont la fonction carbonyle est en bout de chaîne (fonction aldéhyde). Leur formule générale est la suivante :

$$\underset{n}{CH_2OH}-(CHOH)_{n-2}-\overset{1}{C}\begin{matrix} \nearrow O \\ \searrow H \end{matrix}$$

En ce qui concerne la numérotation, le carbone 1 est celui qui porte la fonction aldéhyde.

Les problèmes relatifs à la structure des cétoses sont analogues à ceux des aldoses. Cependant il existe quelques différences.

— La *fonction cétone* voisine d'une fonction alcool primaire correspond donc au *carbone n° 2* d'après notre numérotation.

Ex. : Fructose

$$\underset{6}{CH_2OH}-\underset{5}{CHOH}-\underset{4}{CHOH}-\underset{3}{CHOH}-\underset{2}{CO}-\underset{1}{CH_2OH}$$

— Le remplacement d'une fonction alcool secondaire par une fonction alcool primaire diminue d'une unité le nombre de carbones asymétriques. Par suite, le *nombre d'isomères est moitié moindre :* les cétohexoses possèdent trois carbones asymétriques d'où la possibilité de $2^3 = 8$ isomères répartis en 4 de la série *L* et 4 de la série *D*. Lors d'une transformation aldose ⇄ cétose, deux aldoses épimères conduisent au même cétose et inversement.

D'une manière générale, nous dirons que les *cétoses* sont les oses possédant une fonction carbonyle contiguë à une fonction alcool primaire terminale.

Leur formule générale est :

$$\underset{1}{CH_2OH}-\underset{2}{\overset{}{C}}(=O)-(CHOH)_{(n-3)}-\underset{n}{CH_2OH}$$

Le carbone 1 est celui qui porte la fonction alcool primaire contiguë au carbonyle.

D. Propriétés

Diverses propriétés chimiques sont en accord avec cette structure aldéhydique ou cétonique.

1. OXYDATION ET PROPRIÉTÉS RÉDUCTRICES

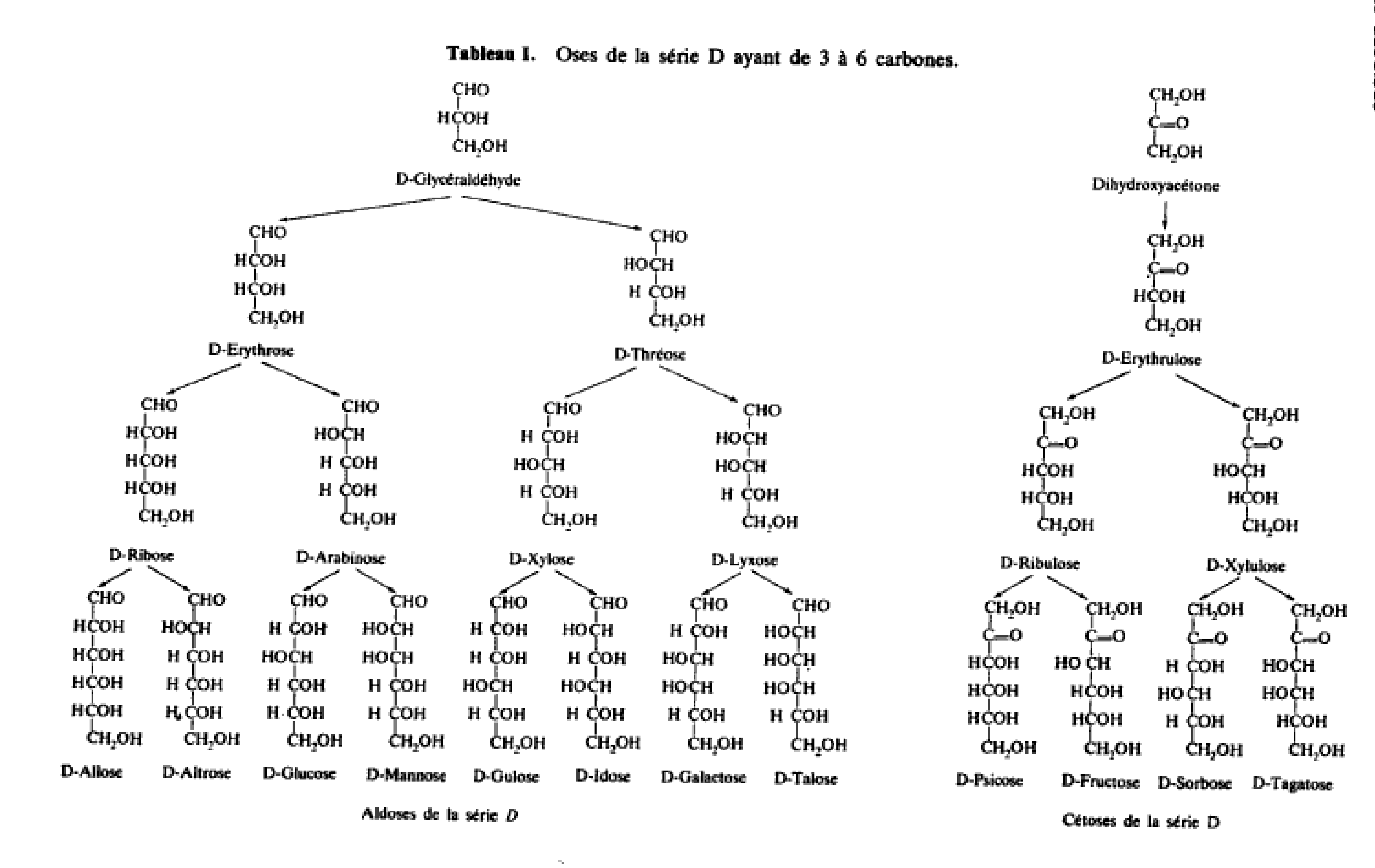
— Selon la nature de l'ose et les conditions de l'oxydation, il est possible d'obtenir différents acides.

a. L'oxydation peut ne porter que sur une seule fonction

— L'*iode et le brome* en milieu faiblement alcalin (mélange tamponné de carbonate et d'hydrogénocarbonate de sodium pour l'iode, carbonate de baryum pour le brome) et à froid oxydent spécifiquement la fonction aldéhyde en acide. Dans ces conditions les cétoses ne sont pas attaqués.

$$\underset{\textit{Aldohexose}}{CH_2OH-(CHOH)_4-CHO} \rightarrow \underset{\textit{Acide aldonique}}{CH_2OH-(CHOH)_4-COOH}$$

Tableau I. Oses de la série D ayant de 3 à 6 carbones.



sorbitol pour le fructose :

$$>C{=}O \rightarrow H{-}C{-}OH \quad \text{et} \quad HO{-}C{-}H$$

H–C=O / CH_2OH — réduction → CH_2OH / CH_2OH

glucose — Glucitol

H–C=O / CH_2OH — réduction → CH_2OH / CH_2OH

mannose — mannitol

CH_2OH / C=O / CH_2OH — réduction → CH_2OH / CH_2OH glucitol ; CH_2OH / CH_2OH mannitol

fructose

— Si la fonction aldéhyde ou cétone a été préalablement protégée par combinaison, l'***oxydation porte*** alors sur la ***fonction alcool primaire***. On obtient ainsi un ***acide uronique*** qui possède un groupement carbonyle,

H–${}_1$C=O / $(CHOH)_{n-2}$ / ${}_nCOOH$ — H–C=O / COOH

Formule générale linéaire d'un acide uronique — Formule linéaire de l'acide glucuronique

Les cétoses forment chacun deux acides uroniques, selon la fonction alcool primaire qui est oxydée.

Ces acides uroniques présentent une très grande importance biologique tant au point de vue structural que fonctionnel.

b. L'oxydation peut porter sur plusieurs fonctions

— *L'acide nitrique* à chaud oxyde les deux fonctions terminales des aldoses formant ainsi des diacides : *acide D saccharique ou D glucarique* COOH—$(CHOH)_4$—COOH pour le *D* glucose, *acide mucique* ou *D* galactarique pour le *D* galactose.

COOH	COOH
COOH	COOH
acide glucarique	acide galactarique

L'oxydation des cétoses est plus complexe, il y a rupture de la chaîne carbonée et formation d'un mélange d'acides carboxyliques.

$$CH_2OH—\overset{O}{\overset{\|}{C}}—(CHOH)_{n-3}—CH_2OH$$

oxydation par l'acide nitrique à chaud ↓

$$H—COOH + COOH—(CHOH)_{n-3}—COOH$$

$$HOOC—COOH + COOH—(CHOH)_{n-4}—COOH$$

— Un cas particulier correspond à l'oxydation des oses par l'*acide périodique* HIO_4. En milieu aqueux et à la température ordinaire, ce réactif oxyde les polyols acycliques et les aldoses en un mélange de méthanal provenant des fonctions alcool primaire et d'acide méthanoïque produit d'oxydation des fonctions alcool secondaire et aldéhyde selon les équations :

$$CH_2OH—(CHOH)_n—CH_2OH + (n+1)\ IO_4^- \rightarrow 2\ HCHO + n\ HCOOH + H_2O + (n+1)\ IO_3^-$$

$$CH_2OH—(CHOH)_n—CHO + (n+1)\ IO_4^- \rightarrow HCHO + (n+1)\ HCOOH + (n+1)\ IO_3^-$$

L'oxydation des cétoses est plus irrégulière.

Le mécanisme de l'oxydation périodique est connu, des oxydations partielles sont possibles, tous les composés intervenant dans les réactions sont facilement

être considérée comme *équivalente à une solution d'oxyde cuivrique* CuO. Les oses réduisent cette liqueur bleue avec *précipitation d'oxyde cuivreux* CuO_2 *rouge*.

D'autres complexes sont, de même, réduits, très souvent avec précipitation du métal réduit.

Ex. : Les *solutions alcalines d'iodomercurate* $\left[HgI_4\right]^{2-}$ sont réduites à chaud avec production d'un précipité gris de mercure ;

— le *nitrate d'argent ammoniacal* $\left[Ag\left(NH_3\right)_2\right]^+$ est réduit à l'état d'argent (expérience du miroir argent) ;

— les *solutions alcalines et tartriques de bismuth* produisent un précipité noir de bismuth ;

— le *ferricyanure de potassium* est transformé en ferrocyanure.

• **Réduction de composés organiques.** — Dans les mêmes conditions expérimentales, les oses réduisent le *bleu de méthylène* en son leucodérivé, l'*acide picrique* (trinitrophénol) en acide picramique (aminodinitrophénol) rouge, le *chlorure de triphényltétrazolium* en triphénylformazan rouge sombre, etc.

Toutes ces réactions, bien que non stœchiométriques, offrent de nombreuses possibilités analytiques très utilisées au laboratoire.

2. DÉSHYDRATATION

• **En milieu neutre ou faiblement acide,** les oses sont ***stables,*** ils ne sont pas hydrolysables.

• **En présence d'acides forts** (HCl, HBr, H_2SO_4, ...) en concentration suffisante et à chaud, les pentoses et les hexoses sont déshydratés pour former du ***furfural*** ou l'un de ses dérivés.

Les pentoses, traités par l'acide chlorhydrique concentré, donnent du *furfural.*

$$\text{Pentose} \xrightarrow{H^+} \text{Furfural} + 3\,H_2O$$

Pentose Furfural

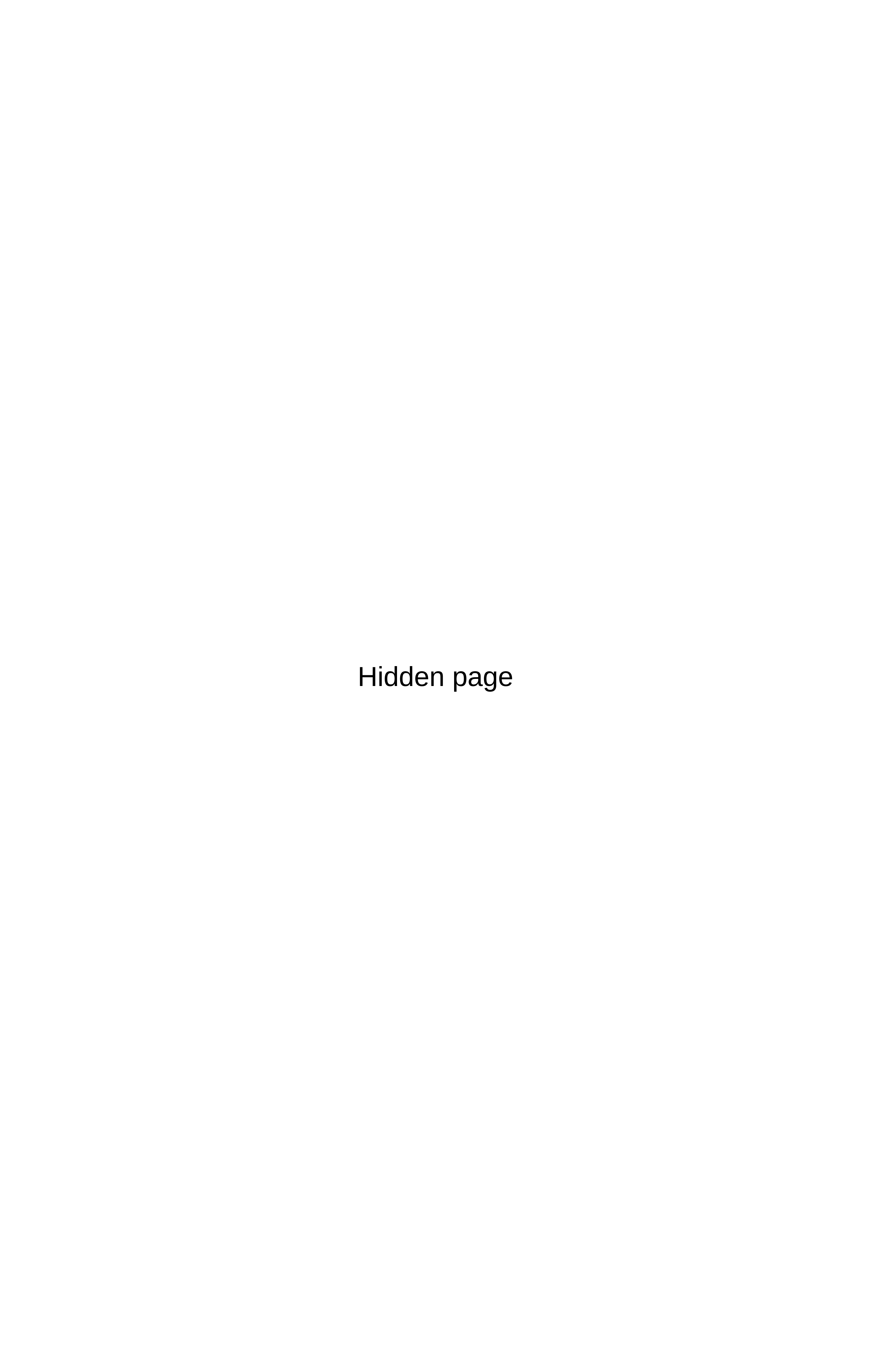
Les hexoses conduisent à l'*hydroxyméthylfurfural,* facilement dédoublé en acide méthanoïque et acide lévulinique.

$$\text{Hexose} \xrightarrow{H^+} HOH_2C\text{—}C_4H_2O\text{—}CHO \rightarrow CH_3\text{—}CO\text{—}CH_2\text{—}CH_2\text{—}COOH + HCOOH$$
$$(-\,3\,H_2O)$$

Hydroxyméthylfurfural Acide lévulinique Acide méthanoïque

Le furfural et ses dérivés peuvent se condenser avec des phénols (résorcinol, orcinol, naphtorésorcinol, α-naphtol, etc.) pour former des dérivés colorés intéressants pour l'analyse (*réactions furfuraliques*).

On peut citer à titre d'exemple : la réaction de Molisch qui caractérise tous les glucides de complexité suffisante ; en milieu sulfurique et à chaud les oses sont


Hidden page

II. FORMULES DÉVELOPPÉES CYCLIQUES

A. Comportements particuliers

En fait, si le glucose se comporte comme un aldéhyde vrai vis-à-vis de certains réactifs, il n'en est pas de même dans toutes les réactions caractéristiques de la fonction. Ainsi :

— Le *glucose ne recolore pas le réactif de Schiff et ne forme pas de dérivé bisulfitique (hydrogénosulfitique).*

— Un *aldéhyde vrai* peut réagir en milieu acide avec deux molécules d'alcool pour former un dérivé dialcoylé : un *acétal.*

$$R{-}CHO \overset{R'-OH}{\rightleftarrows} R{-}C(OH)(OR'){-}H \overset{R'-OH}{\rightleftarrows} R{-}C(OR')(OR'){-}H + H_2O$$

Aldéhyde — Semi- ou hémi-acétal — Acétal

L'acétal peut aussi être considéré comme un éther-oxyde d'hydrate d'aldéhyde qui est un composé instable.

$$R{-}C(=O){-}H + H_2O \rightleftarrows R{-}C(OH)(OH){-}H + 2\,R'{-}OH \rightleftarrows R{-}C(OR')(OR'){-}H + 2\,H_2O$$

Aldéhyde — Hydrate d'aldéhyde — Acétal

Le *glucose* par action du méthanol en présence de HCl anhydre ne réagit qu'avec une seule molécule pour former un *méthylglucoside* et de l'eau. Plus précisément il se forme deux isomères, les méthylglucosides α et β, mais la réaction est bien analogue au passage hémi-acétal, acétal.

$$C_6H_{12}O_6 + CH_3{-}OH \rightleftarrows C_6H_{11}O_5{-}O{-}CH_3 + H_2O$$

— Lors de l'acétylation du *D* glucose on obtient aussi deux penta-acétates α et β estérifiés sur les carbones n° 1, 2, 3, 4 et 6. Ce qui est en parfait désaccord avec la formule linéaire du glucose.

Ces diverses constatations ont conduit à admettre l'existence d'une ***liaison de type hémi-acétalique*** entre la fonction aldéhyde et l'une des fonctions alcool de la chaîne.

B. Les formes pyranniques

— L'étude des méthylglucosides α et β permet de conclure à une liaison avec l'hydroxyle fixé sur le 5e carbone *(pont 1 – 5)* pour le glucose naturel. La fonction aldéhydique incluse dans la liaison hémi-acétalique est parfois qualifiée de *« pseudo-aldéhydique » :*

D glucose aldéhydique — Forme hydratée — D glucose hémi-acétalique (α, β)

Cette liaison fait apparaître une *nouvelle asymétrie* sur le carbone n° 1 à laquelle correspondent deux isomères désignés par les lettres α et β. Ces deux isomères particuliers, encore appelés *anomères,* sont stables, ils ont été isolés à l'état cristallisé mais le passage de l'un à l'autre est facile en solution et aboutit à un équilibre (p. 160). Ils diffèrent par leurs propriétés physiques donc par leurs pouvoirs rotatoires (ce ne sont pas des inverses optiques). La forme α obtenue par cristallisation à partir d'une solution aqueuse a pour pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_D^{20°C} = +113°$, la forme β résultant de la cristallisation à partir d'une solution dans l'acide acétique ou la pyridine a pour pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_D^{20°C} = +19°$.

Au mode de représentation en projection utilisé jusqu'alors et qui ne tient pas

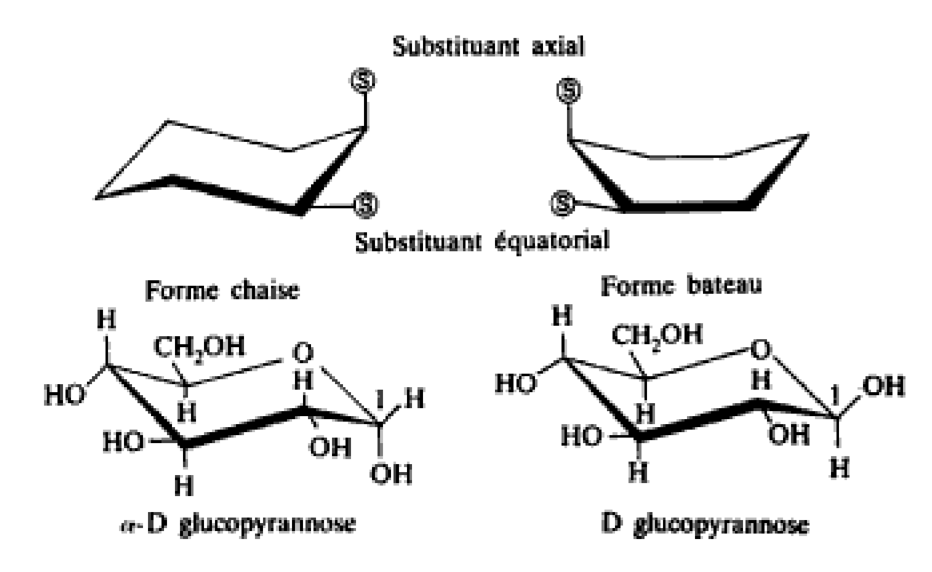


Figure 5.1 Conformations du D glucopyranose.

compte de la disposition spatiale des atomes, il est préférable de substituer le mode de représentation en perspective dû à Haworth.

Les formules cycliques sont à rapprocher d'hétérocycles connus en chimie organique. Dans la liaison 1 – 5 il s'agit du pyranne (1), le glucose est sous *forme pyrannique* et selon le cas on parle d'α-D *glucopyrannose* ou de β-D *glucopyrannose.* Dans cette représentation (fig. 5.2), le cycle est horizontal, les hydroxyles et les hydrogènes étant placés au-dessus ou au-dessous de son plan selon leurs positions sur la formule en projection. La forme α, qui a le pouvoir rotatoire le plus élevé pour l'ose de la série *D*, a son hydroxyle porté par le carbone n° 1 situé au-dessous du cycle ; la forme β, dans laquelle tous les hydroxyles alternent régulièrement, a son premier hydroxyle inversé.

Figure 5.2 Formules pyranniques du D glucose.
Passage de la formule aldéhydique linéaire aux formules en perspectives (formules complètes et formules simplifiées).

(1) Les mots pyranne, furanne et les termes dérivés sont souvent orthographiés avec deux *n* pour préciser qu'ils n'ont pas de rapport avec les alcanes.

Enfin, il faut signaler que, dans les formes pyranniques stables, l'hétérocycle n'est pas plan. Il peut, comme le cyclohexane, adopter diverses conformations, les deux principales étant la *forme bateau* et la *forme chaise* (fig. 5.1). Cette dernière doit prédominer largement par suite de sa plus grande stabilité, ce qui est confirmé par les déterminations physiques. De plus le β-D glucopyrannose doit l'emporter sur la forme α. Tous les substituants étant en position équatoriale, il est plus stable. Cette prévision énergétique est vérifiée, au moins en solution où la forme β domine, ce qui n'empêche pas la forme α d'être la plus abondante dans le glucose industriel cristallisé à partir d'une solution aqueuse.

C. Les formes furanniques

Lors de la formation des α et β-méthylglucosides on a mis en évidence un troisième isomère, le γ-méthylglucoside, dans lequel la liaison hémi-acétalique se fait entre la fonction aldéhyde et l'hydroxyle porté par le quatrième carbone *(pont 1 – 4)*.

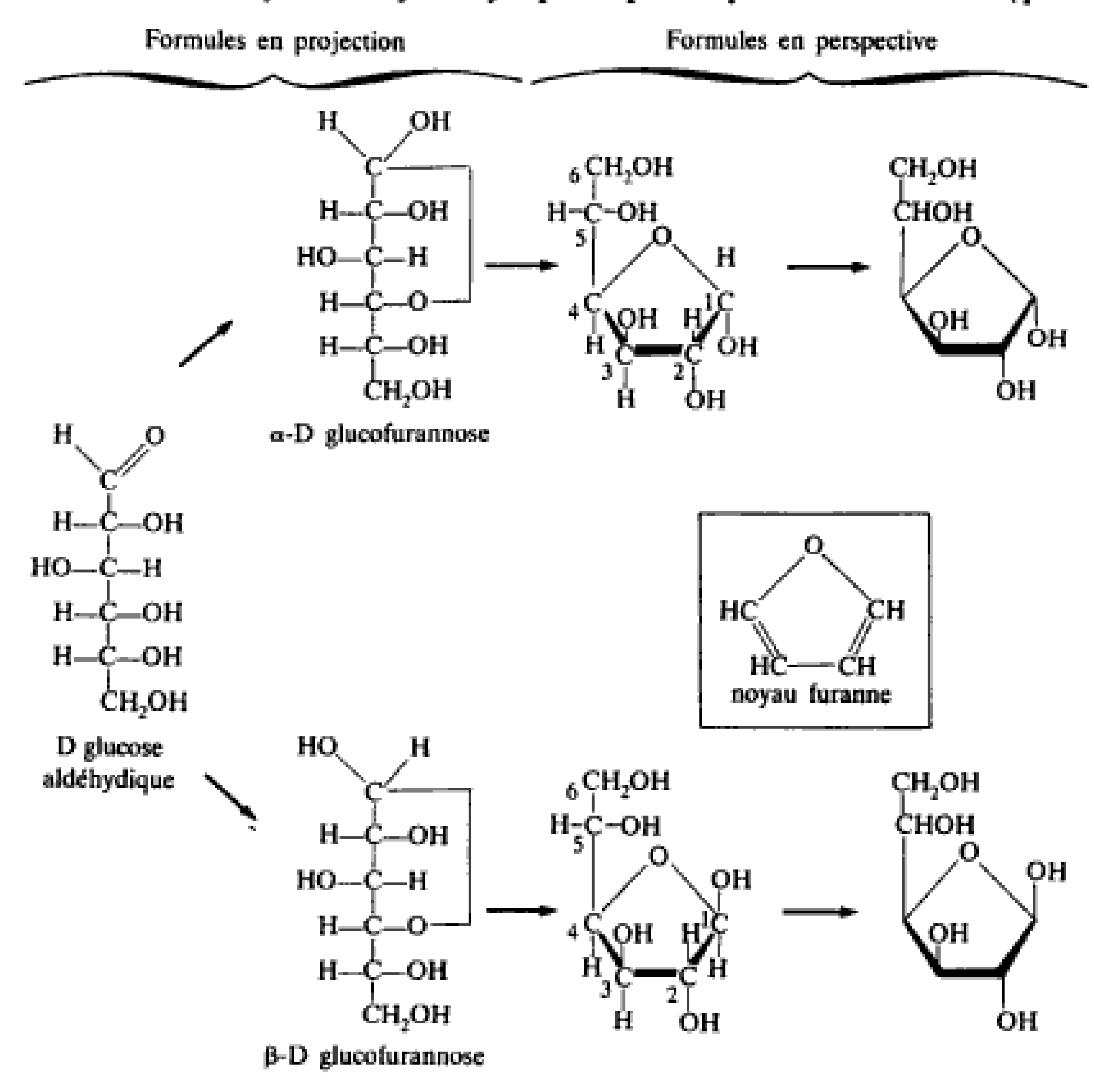


Figure 5.3 Formules furanniques du D glucose.

Ce nouvel hétérocycle est à rapprocher du noyau furanne à cinq sommets et l'on parle alors de glucose *furannique* ou *glucofurannose* (fig. 5.3) avec ses deux isomères α et β. Toutefois cette dernière forme n'est pas stable à l'état libre et si l'on tente de l'isoler, elle se transforme en forme pyrannique.

D. Contribution de l'oxydation periodique à l'analyse des structures cycliques des oses

Comme cela a été décrit antérieurement (p. 147), l'acide periodique oxyde les oses ; en appliquant cette réaction au glucose sous forme aldéhydique, le bilan s'écrit :

$$\text{glucose (H–C=O} \ldots CH_2OH) + 5\,HIO_4 \rightarrow H_2C{=}O + 5\,H{-}COOH + 5\,HIO_3$$

Que devient ce bilan pour le glucose sous forme pyrannique ?

Plusieurs mécanismes d'oxydation des oses cycliques ont été postulés.

En solution aqueuse, il existe un équilibre tautomère entre 3 formes du glucose : l'α-*D* glucopyrranose, le β-*D* glucopyrranose et le *D* glucose aldéhydique (p. 160).

Il est vraisemblable que l'action de l'acide periodique porte essentiellement sur le glucose aldéhydique ; sa disparition déplace l'équilibre des formes pyranniques vers la forme linéaire. Le bilan de l'oxydation est donc le même pour le glucopyrranose et pour le glucose linéaire.

$$\text{pyranose } (CH_2OH) \rightleftharpoons \text{glucose linéaire (H–C=O} \ldots CH_2OH) \rightleftharpoons \text{pyranose } (CH_2OH)$$

$$\downarrow 5\,HIO_4$$

$$5\,HIO_3 + H{-}CHO + 5\,H{-}COOH$$

En revanche, si la fonction hémi-acétalique est bloquée, la forme linéaire n'existe pas, l'oxydation porte sur la forme cyclique et ne sera que partielle. Elle peut contribuer à déterminer la nature du cycle.

La fonction hémi-acétalique est bloquée sous forme de méthyloside, pour cela l'ose est soumis à l'action du méthanol chlorhydrique en milieu anhydre.

L'oxydation d'une mole de méthyl *D*-glucopyrranoside consomme deux moles d'acide périodique et libère une mole d'acide méthanoïque.

$$CH_2OH\text{-glucopyranoside}-O-CH_3 + 2\,HIO_4 \rightarrow \text{dialdéhyde} + H{-}COOH + 2\,HIO_3 + H_2O$$

$\downarrow H_2O$

Forme hydratée du dérivé d'oxydation

Le dérivé d'oxydation du méthyl glucoside est stabilisé, en solution, par hydratation.

L'oxydation d'une mole de méthyl *D*-arabinofuranoside consomme une mole d'acide periodique et ne libère pas de molécule monocarbonée.

$$HOH_2C\text{-furanoside}-O-CH_3 + HIO_4 \rightarrow \text{dialdéhyde} + HIO_3 + H_2O$$

$\downarrow H_2O$

Forme hydratée du dérivé d'oxydation

E. Dérivés à structure hémi-acétalique

1. LES OSIDES

Les oses peuvent se combiner dans des conditions variées, avec de nombreux composés : alcools, phénols, amines, acide o-phosphorique, etc. Parmi les produits formés, beaucoup ont une importance biologique fondamentale. Ces réactions

entraînent la disparition du pouvoir réducteur et le plus souvent stabilisent la structure de l'ose sous la forme α et β.

— **Condensation avec les hydroxyles alcooliques ou phénoliques.** — Nous avons signalé, lors de l'étude des structures et dans le paragraphe précédent, la condensation, en milieu chlorhydrique, du glucose et du méthanol pour former des méthylglucosides.

$$\text{Glucose } \alpha + CH_3OH \rightleftharpoons \alpha\text{-méthylglucoside} + H_2O$$

Glucose α — α-méthylglucoside

La *liaison acétalique* formée, résultant de la combinaison d'un hydroxyle hémi-acétalique de l'ose et d'un hydroxyle alcoolique avec élimination d'eau, est appelée *liaison osidique* ou encore *glycosidique* et le composé obtenu *oside*. Si l'hydroxyle alcoolique appartient à une autre molécule d'ose, l'oside est un *holoside*, si au contraire il provient d'un alcool ou d'un phénol, l'oside est un *hétéroside*, le composé non glucidique étant qualifié d'aglycone, quelle que soit sa nature.

Dans la désignation de l'oside, on précise la nature de l'ose ayant réagi, sa forme α ou β, pyrannique ou furannique et la structure de l'*aglycone*. Ainsi, dans l'exemple ci-dessus, l'oside formé est l'α*D*-méthylglucopyrannoside. Toutefois, la terminologie est souvent simplifiée en tenant compte des conditions naturelles (le glucose naturel appartient à la série *D*, il est sous forme pyrannique), d'où le terme d'α-méthylglucoside.

Inversement *les osides peuvent être hydrolysés*, plus ou moins facilement, en leurs constituants, soit en milieu acide (HCl, H_2SO_4) et à chaud, soit par des enzymes généralement spécifiques de la structure α ou β de l'ose engagé dans la liaison (on parle d'α-glucosidase, de β-fructosidase, de β-galactosidase, etc.). La liaison osidique est, par contre, assez stable en milieu alcalin : c'est une liaison acétalique et non une liaison ester.

— **Condensation avec d'autres composés.** — De la même façon, les oses peuvent se combiner :

— avec l'*ammoniac et les amines* pour former des hétérosides azotés ou *N hétérosides*, selon le schéma :

$$-OH + R{-}NH_2 \rightarrow -NH{-}R + H_2O$$

— avec l'*acide phosphorique*. Le produit obtenu correspond à un phosphate hétéroside mais on le désigne habituellement comme un ester phosphorique bien qu'il soit stable en milieu alcalin.

Ex. : Acide α*D*-glucopyrannosyl-1-phosphorique ou glucose-1-phosphate ou ester de Cori.

La condensation des oses avec l'*acide cyanhydrique* et les *thiols* est différente. C'est ainsi qu'en milieu acide, le glucose se combine avec les thiols, *R*—SH, pour former un *mercaptal*, en se comportant comme un aldéhyde vrai :

$$CH_2OH{-}(CHOH)_4{-}CHO + 2\,R{-}SH \rightarrow CH_2OH{-}(CHOH)_4{-}CH(SR)_2 + H_2O$$

Mercaptal

Il est toutefois possible d'obtenir également des hétérosides sulfurés ou *S hétérosides* dans lesquels l'ose conserve sa structure cyclique.

2. LES ESTERS

— Les oses, composés polyhydroxylés, forment de nombreux esters.

— Parmi les *esters minéraux* (esters nitriques, sulfuriques, boriques et phosphoriques), les plus importants en biochimie sont les *esters phosphoriques* qui constituent les stades intermédiaires du métabolisme des glucides. Dans les conditions naturelles, ces composés se ramènent à un nombre limité de types. Le plus souvent, l'acide phosphorique est lié à une fonction alcool primaire, sous forme de *monoester*. Il en résulte une seule possibilité pour les aldoses et plusieurs pour les cétoses.

Ex. :

— acide α-glucopyrannose-6-phosphorique ou glucose-6-phosphate ou ester de Robison :

— acide α-fructofurannose-6-monophosphorique ou fructose-6-phosphate ou ester de Neuberg :

— acide α-fructofurannose-1-6-diphosphorique ou fructose-1-6-diphosphate ou ester de Harden et Young :

H_2PO_3—O—H_2C O CH_2—O—PO_3H_2
HO
OH
OH

Ces esters, réducteurs, sont assez facilement hydrolysés en milieu alcalin avec libération du phosphate si le groupement réducteur est libre. Il en est de même pour l'hydrolyse acide.

Les aldoses peuvent être également combinés avec deux radicaux phosphoriques lorsque l'estérification de la fonction alcool primaire porte sur une molécule d'ose liée à un reste phosphate par une liaison osidique.

Ex. : Acide phospho-6-α-glucopyrannosylphosphorique ou glucose-1-6-diphosphate.

CH_2—O—PO_3H_2
O
OH
HO O—PO_3H_2
OH

Tous ces dérivés phosphorés, *particulièrement réactionnels,* subissent de nombreuses *interconversions* au cours du métabolisme glucidique.

Ex. :

glucose-1-phosphate ⇄ glucose-6-phosphate ⇄ fructose-6-phosphate

Dans quelques cas l'acide phosphorique forme des *diesters* d'oses et assure alors la liaison entre deux molécules (voir p. 195).

— *Les esters organiques* (esters acétiques, benzoïques), rares parmi les composés naturels, permettent par suite de leurs propriétés physiques ou bien d'identifier un ose, ou bien de déterminer le nombre et la position de ses hydroxyles libres.

3. LES ÉTHER-OXYDES

La formation d'éther-oxydes permet de protéger et de localiser une fonction alcool libre sur une molécule d'ose. La préparation d'éther-oxydes méthyliques, ou *méthylation*, des glucides est à la base de leur étude structurale.

Si l'on méthyle, selon une technique qui est d'ailleurs complexe, un holoside, seuls les hydroxyles libres formeront un éther-oxyde du méthanol. Le produit formé, soumis à une hydrolyse acide ménagée, libérera les oses méthylés qui le constituent sans rompre les liaisons éther-oxydes. Les produits obtenus, séparés par chromatographie, seront ensuite analysés, dosés et identifiés, ce qui permettra de connaître la position des hydroxyles engagés dans les liaisons osidiques.

Ex. : Soit un oside de structure :

Méthylation par ICH_3 ou $(CH_3)_2SO_4$

Hydrolyse acide ménagée

2-3-4-6-tétraméthylgalactose

2-3-6-triméthylglucose

Ce qui permet de conclure que dans l'oside, l'hydroxyle en 4 du glucose est inclus dans la liaison osidique.

Le dérivé méthylé en 1 du glucose est hydrolysé en milieu acide car c'est un acétal. De plus, nous supposons connues les structures pyranniques des oses, sinon le problème ne peut pas être tranché grâce à cette seule technique. En effet, le glucose a deux hydroxyles combinés (4 et 5) d'où les deux possibilités :

liaison en 4 et forme pyrannique

ou

liaison en 5 et forme furannique

D'autres dérivés, acide glucuronique, acide gluconique présentent également la possibilité d'une structure cyclique ils seront étudiés à propos de la classification des oses.

III. L'ÉQUILIBRE TAUTOMÈRE

D'après ce qui précède, le glucose réagit :

— tantôt comme un aldéhyde vrai, en particulier vis-à-vis des réactifs du groupement carbonyle $>C = 0$,

— tantôt comme un composé hémi-acétalique vis-à-vis des réactifs des groupements hydroxyles —OH. Comment expliquer ce double comportement ?

Le glucose naturel est un mélange de la forme aldéhydique et des deux formes cycliques α et β glucopyrannoses. Ces dernières dominant toujours très largement (95 à 99 %).

• **A l'état cristallisé** c'est la forme α qui est la plus abondante et il n'y a pas possibilité de conversion d'une forme dans l'autre. C'est le cas en particulier pour le glucose industriel préparé par hydrolyse acide de l'amidon.

• **En solution** il s'établit progressivement un équilibre entre les trois formes.

CH_2OH O H O CH_2OH O ⇄ C ⇄ CH_2OH

β-D glucopyrannose ⇄ D glucose aldéhydique ⇄ α-D glucopyrannose

Quand celui-ci est atteint c'est la forme β qui est alors la plus abondante mais, en présence d'un réactif et dans des conditions expérimentales déterminées (température, pH) il y a possibilité d'un déplacement rapide vers la forme réagissante, d'où le double comportement.

Cette possibilité disparaît quand le groupement pseudo-aldéhydique est inclus dans une liaison de type osidique, la structure α ou β est alors bloquée et le groupement n'est plus réducteur.

Dans les réactions faisant intervenir les structures cycliques, il faudrait envisager les deux formes α et β. Pour simplifier un seul cas a généralement été décrit ci-dessus dans les équations de réaction. Une autre solution consiste à écrire la formule du glucose sans faire apparaître l'anomérie, par exemple sous la forme :

CH_2OH O OH HOH HO OH

En plus d'un intérêt théorique en chimie organique, la structure des glucides permet :

• **D'expliquer certaines propriétés.**

— La ***mutarotation*** qui correspond aux variations de pouvoir rotatoire accompagnant la conversion α ⇄ β jusqu'à la valeur d'équilibre. Partant de glucose industriel, dans lequel la forme α domine ($[\alpha]_D^{20°C} = +113°$), la solution initiale a un pouvoir rotatoire élevé qui décroît dans le temps au fur et à mesure de la transformation α → β. Lorsque, après quelques heures, l'équilibre est atteint, le pouvoir rotatoire spécifique se stabilise à + 52,5 °C, valeur correspondant à environ

65 % d'anomère β, 35 % d'anomère α, plus une faible quantité de forme linéaire aldéhydique 0,1 % environ.

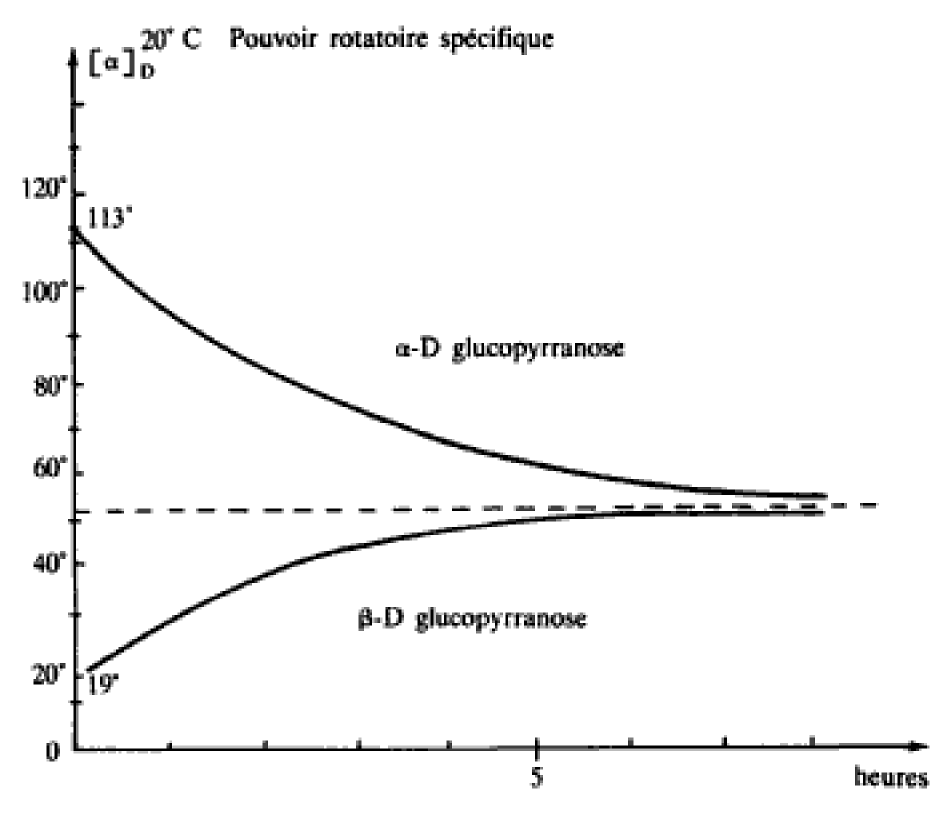


Figure 5.4 Mutarotation du glucose.

— Les ***comportements*** vis-à-vis des réactifs chimiques. En solution un ose présente toujours *un équilibre entre ses formes aldéhydique et cyclique,* cet équilibre tautomère étant en faveur des formes cycliques (95 %).

L'ose peut donc réagir comme un aldéhyde vrai vis-à-vis des réactifs de cette fonction et comme un composé hétérocyclique vis-à-vis, en particulier, des réactifs des fonctions alcool.

— Les ***isomérisations*** et l'identité, lors de certaines réactions, des produits obtenus à partir d'oses différents. ***Ex.*** : Osazones (p. 155).

• **D'interpréter les réactions biochimiques.** — Ces réactions catalysées par des ***enzymes*** sont essentiellement ***stéréospécifiques.***

Ex. : Le *D* glucose et le *D* fructose sont fermentescibles par la levure de bière, les formes *L* et le *D* galactose ne le sont pas.

Le saccharose, les amidons, les glycogènes sont dérivés de l'α*D*-glucopyrannose, ils sont hydrolysés par les enzymes de nos sucs digestifs ; la cellulose dérivée du β*D*-glucopyrannose ne l'est pas.



D. Les heptoses

Seul le ***sédoheptulose,*** cétose intervenant dans les réactions d'interconversion du métabolisme glucidique, sera cité ici.

II. LES DÉRIVÉS D'OSES

Ces composés, toujours associés aux oses et présentant certaines de leurs propriétés, sont très variés. Nous retiendrons :

A. Les désoxy-oses ou désoses

Ils correspondent à l'enlèvement d'un atome d'oxygène à un hydroxyle, généralement en 2 ou en 6.

Ex. : le ***L-rhamnose*** (6-*désoxy-L-mannose*) et le ***L-fucose*** (6-*désoxy-L galactose*) que l'on peut aussi considérer comme des méthylpentoses.

— Le ***D-désoxyribose*** (2-*désoxy*-D-*ribose*) présent dans toutes les cellules comme constituant des nucléotides :

CHO	CHO	CHO
H—C—OH	HO—C—H	CH_2
H—C—OH	H—C—OH	H—C—OH
HO—C—H	H—C—OH	H—C—OH
HO—C—H	HO—C—H	CH_2OH
CH_3	CH_3	
L-rhamnose	L-fucose	Désoxyribose

Les désoxy-oses présentent les structures et la plupart des propriétés des oses. Le désoxyribose qui ne forme pas d'osazone, possède la particularité de recolorer le réactif de Schiff.

Des 3-6-didésoxy-hexoses entrent dans la constitution de parois bactériennes.

B. Les oses aminés

Ils résultent du remplacement d'un hydroxyle par une fonction amine primaire. Les deux plus importants, la ***glucosamine*** ou *chitosamine* (*aminodésoxy* 2 *D-glucose*) et la ***galactosamine*** ou *chondrosamine* (*aminodésoxy* 2 *D-galactose*), sont présents dans de nombreux glucides complexes et dans certains lipides. Leur fonction amine est alors le plus souvent acétylée (dérivé N acétylé).

On peut y adjoindre les ***acides neuraminiques*** et leurs dérivés N acétylés ou *acides sialiques* ainsi que l'*acide muramique*.

β*D*-glucosamine

β*D*-galactosamine

Acide neuraminique

C. Les acides uroniques

Ce sont les produits d'oxydation de la fonction alcool primaire des oses.

L'***acide glucuronique*** entre dans la constitution d'osides mais, de plus, il peut par son groupement réducteur se combiner avec de nombreuses substances hydroxylées, favorisant ainsi leur solubilité aqueuse et leur élimination urinaire. Ce processus de *détoxication* ou *glucuroconjugaison* est à la base de l'élimination de substances naturelles (hormones thyroïdiennes et sexuelles, pigments biliaires) et de toxiques (dérivés phénoliques, certains médicaments).

L'***acide galacturonique*** est un constituant des gommes, des mucilages et des pectines.

Acide β*D*-glucuronique

Acide β*D*-galacturonique

D. Les polyols acycliques

Ils dérivent de la réduction des aldoses et des cétoses. ***Ex.*** : Le ***glycérol*** dérivant du glycéraldéhyde, le ***ribitol*** du ribose, le ***sorbitol*** (ou glucitol) du glucose, etc.

CH_2OH
CHOH
CH_2OH

Glycérol

CH_2OH
H—C—OH
H—C—OH
H—C—OH
CH_2OH

D-ribitol

CH_2OH
H—C—OH
HO—C—H
H—C—OH
H—C—OH
CH_2OH

D-sorbitol

E. Composés divers

— des *oses à structure ramifiée.* ***Ex.*** : L'*apiose* qui est un pentose ramifié ;
— des *dérivés d'oses.*

O═C—
HO—C
HO—C   O
H—C—
HO—C—H
CH_2OH

Acide
L-ascorbique

$\underset{+2H}{\overset{-2H}{\rightleftharpoons}}$

O═C—
O═C
O═C   O
H—C—
HO—C—H
CH_2OH

Acide
L-déhydro-ascorbique

Ex. : Le *streptose*, qui fait partie de la molécule de streptomycine, est un désoxypentose possédant une seconde fonction aldéhyde.

L'*acide L-ascorbique* ou *vitamine C* qui est la lactone de l'acide 2-céto *L* gulonique (le gulose est un hexose).

Par son *groupement ène-diol*, c'est un *réducteur puissant* vis-à-vis de la liqueur de Fehling, du nitrate d'argent ammoniacal, de l'iode, du bleu de méthylène et du 2-6-dichlorophénolindophénol. La transformation réversible en acide déhydroascorbique lui permet de participer aux oxydoréductions cellulaires.

Présent dans la plupart des aliments frais d'origine végétale, l'acide ascorbique

est également synthétisé par de nombreux animaux. Toutefois l'homme et le cobaye ne peuvent réaliser cette synthèse au cours de leur métabolisme glucidique ; comme cette substance leur est indispensable, c'est l'alimentation qui doit la leur apporter. L'acide *L*-ascorbique (la forme *D* étant inactive) est pour eux une *vitamine,* du groupe hydrosoluble.

Structure des osides

Les osides sont des composés résultant de l'union d'un certain nombre de molécules d'oses et éventuellement d'une *aglycone* par des liaisons osidiques.

I. MÉTHODES D'ÉTUDE

L'oside doit tout d'abord être extrait, isolé et purifié en évitant au maximum toute altération de la structure d'où la nécessité d'éviter les traitements chimiques trop énergétiques et d'inhiber les enzymes.

• **L'hydrolyse totale,** par voie chimique, en milieu acide (acide minéral fort dilué, pH = 1 à 2, à chaud) et l'identification des produits obtenus permettent de connaître la composition de l'oside.

Ex. : L'amidon, le glycogène, le maltose ne libèrent que du glucose, le lactose fournit du glucose et du galactose, etc.

Le dosage des oses libérés et la détermination de la masse molaire de l'oside complètent les données de cette hydrolyse.

Ex. : Le lactose est constitué par 1 résidu glucose et 1 résidu galactose, le maltose par 2 résidus glucose, l'amidon et le glycogène par ***n*** résidus glucose ; ***n*** étant élevé et variable.

• **Les hydrolyses partielles** et surtout les ***hydrolyses enzymatiques*** beaucoup plus spécifiques, précisent la structure des oses engagés dans les liaisons osidiques.

Ex. : L'*α-glucosidase* intestinale hydrolyse les osides dans lesquels le glucose α est engagé dans la liaison osidique par son groupement réducteur et n'est pas substitué sur sa fonction alcool primaire. L'α-glucosidase détache le glucose du maltose, du saccharose, mais non du lactose (groupement réducteur du glucose libre) ni du cellobiose (glucose sous forme β).

• **La méthylation** suivie d'hydrolyse acide ménagée, l'**oxydation par l'acide periodique...** permettent de fixer la position de la liaison osidique et la forme pyrannique ou furannique des oses constitutifs.

Ex. : Le maltose est constitué de résidus de glucose sous forme pyrannique, la liaison osidique se fait avec l'hydroxyle du quatrième carbone d'un résidu : c'est un αD-glucopyrannosyl 1 → 4 D-glucopyrannose.

• **Des études physiques** sont nécessaires pour déterminer l'agencement spatial des macromolécules glucidiques.

II. RÉSULTATS

Les résultats de l'étude de la structure des osides servent à établir leur classification, en particulier celle des holosides. On distingue :

• Les **oligoholosides ou oligosides ou oligosaccharides** dans lesquels moins de dix résidus d'oses sont associés. Selon le mode d'association, les uns sont réducteurs, les autres pas et l'on parle parfois d'*osidoses* pour les premiers et d'*osidosides* pour les seconds. Les oligosides sont classés d'après le nombre de résidus en : diholosides, triholosides, tétraholosides, etc.

• Les **polyholosides ou polyosides ou polysaccharides,** formés par l'enchaînement de plus de dix restes d'oses. Ce sont des composés généralement macromoléculaires, non réducteurs, qui peuvent être *homogènes,* leur hydrolyse ne libère alors qu'une seule variété d'oses ou *mixtes*, c'est-à-dire constitués par l'assemblage de plusieurs variétés d'oses.

— Les premiers sont répartis d'après l'ose qui est condensé.

Ex. : Arabanes, xylanes, glucosanes, fructosanes.

— Les seconds sont subdivisés en *polyholosides mixtes* et *polyholosides des glycoprotéides,* ces derniers étant toujours associés à une fraction protéique plus ou moins importante.

Les holosides

Ils sont constitués uniquement par l'association de résidus d'oses.

I. LES OLIGOHOLOSIDES

Ce sont des composés hydrosolubles et dialysables.

A. Les diholosides

Les plus importants, de formule brute $C_{12}H_{22}O_{11}$, sont formés par l'union de deux molécules d'hexoses et suivant la position de la liaison osidique on peut les classer en deux catégories.

Dans la *première catégorie,* la liaison osidique inclut deux hydroxyles hémiacétaliques comme c'est le cas pour le tréhalose formé par l'association de deux α*D*-glucopyrannoses.

Tréhalose ou α*D*-glucopyranosyl 1 → 1 α*D*-glucopyranoside

Les disaccharides du *type tréhalose* ne présentent pas toutes les propriétés des oses ; ils sont stables en milieu alcalin, non réducteurs, ne forment pas d'osazone et ne présentent pas de mutarotation. Le sucre le plus important de cette série est le ***saccharose*** ou ***sucrose.***

Dans la *seconde catégorie,* la liaison osidique inclut un hydroxyle hémiacétalique et un hydroxyle alcoolique, souvent le quatrième comme c'est le cas pour le maltose.

Les disaccharides du *type maltose* présentent non seulement l'isomérie α, β mais également les différentes propriétés des oses. Outre le ***maltose,*** le ***lactose*** est le représentant le plus répandu de cette série.

Maltose ou α*D*-glucopyranosyl 1 → 4 *D*-glucopyranose

1. LE SACCHAROSE

C'est un solide blanc, bien cristallisé à l'état anhydre et très soluble dans l'eau. Ses solutions sont dextrogyres $\left([\alpha]_D = +66{,}5°\right)$. Répandu dans l'ensemble du règne végétal, le saccharose est abondant dans la racine de betterave et la tige de canne à sucre qui constituent les matières premières de l'industrie sucrière. Cet aliment cristallisé est pratiquement un corps pur (plus de 99 % de saccharose).

L'hydrolyse acide du saccharose, qui est facile et rapide, libère du glucose et du fructose en proportions équimoléculaires :

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$$

Saccharose		Glucose	Fructose
$[\alpha] = +66{,}5°$		$[\alpha] = +52{,}5°$	$[\alpha] = -92°$

La réaction est accompagnée d'une *inversion* du sens de déviation de la lumière polarisée, le saccharose dextrogyre étant transformé en un mélange lévogyre. Cette hydrolyse a reçu le nom d'*inversion du saccharose* et le mélange obtenu celui de *sucre inverti*. Un tel mélange est abondant dans le miel.

Le saccharose est constitué par l'union d'une molécule d'α*D*-glucopyranose et d'une molécule de β*D*-fructofuranose selon le type tréhalose.

Saccharose ou α*D*-glucopyranosyl 1 → 2 β*D*-fructofuranoside

Il est donc hydrolysable à la fois par les *α-glucosidases* comme la *maltase* intestinale et par les *β-fructosidases* comme l'*invertase* de la levure de bière. L'absence d'un certain nombre de propriétés des oses a déjà été signalée ; elle découle de cette structure.

2. LE MALTOSE

C'est un disaccharide dextrogyre $\left([\alpha]_D = +136°\right)$, peu abondant à l'état libre, sauf dans le malt où il résulte de l'hydrolyse enzymatique de l'amidon. La forme β domine à l'état cristallisé.

Maltose ou α*D*-glucopyranosyl 1 → 4 *D*-glucopyranose

Ce sucre hydrolysable par les *α-glucosidases* en deux molécules de glucose forme une osazone caractéristique. Il est préparé par hydrolyse de l'amidon.

3. LE LACTOSE

Il cristallise avec une molécule d'eau. Soluble dans l'eau, ses solutions sont peu sucrées et dextrogyres $\left([\alpha]_D = +55{,}5°\right)$. On le trouve dans les laits de Mammifères (4 à 5 % dans le lait de vache, 5 à 7 % dans le lait de femme). Contrairement aux deux précédents, il n'est pas fermentescible sous l'influence de la levure de bière mais diverses bactéries le font fermenter avec une production plus ou moins importante d'acide lactique CH_3—CHOH—COOH.

Ce disacharide est hydrolysable par les acides et les β-*galactosidases* comme la *lactase*. Son osazone soluble à chaud en milieu aqueux cristallise en oursins au refroidissement.

Lactose ou β*D*-galactopyranosyl 1 → 4 *D*-glucopyranose

4. AUTRES DIHOLOSIDES

Nous retiendrons là deux exemples, utiles pour l'étude des polyholosides, mais peu importants à l'état libre.

— le *cellobiose* ou β*D*-glucopyranosyl 1 → 4*D*-glucopyranose :

— l'*isomaltose* ou α_D-glucopyranosyl 1 → 6_D-glucopyranose :

B. Autres oligoholosides

Ce sont surtout des composés d'origine végétale et nous prendrons comme exemple le *raffinose,* trisaccharide qui accompagne le saccharose dans les racines de betterave. Ce sucre non réducteur peut être considéré comme un galactoside du saccharose, de formule :

Saccharose

α-galactopyranose α-glucopyranose β-fructofuranose

Mélibiose

Raffinose ou α*D*-galactopyranosyl
1 → 6 α*D*-glucopyranosyl 1 → 2 β*D*-fructofuranoside

II. LES POLYHOLOSIDES

Ces glucides résultent de l'enchaînement de résidus d'oses, eux-mêmes le plus souvent groupés en disaccharides. Cette association qui peut aller de 15 à plusieurs milliers de résidus conduit à des composés de masse moléculaire élevée.

A. Les polyholosides homogènes

Là encore, ce sont les produits de condensation du glucose (glucosanes) qui sont les mieux représentés par la trilogie : amidons, glycogènes, celluloses.

1. L'AMIDON

Il peut représenter jusqu'à 30 ou 60 % du poids sec d'un tissu végétal. C'est la principale réserve glucidique des végétaux et l'aliment glucidique le plus important pour l'homme. Il est abondant dans les graines et les tubercules mais aussi largement répandu dans beaucoup de cellules végétales.

L'amidon est formé de petits grains d'aspect microscopique spécifique (fig. 5.6) dans lesquels on observe généralement autour d'un *hile* ponctiforme ou étoilé des zones concentriques alternativement foncées (très hydratées) et claires (peu hydratées). Les grains sont biréfringents, donc anisotropes, et présentent le phénomène de la croix noire au microscope polarisant.

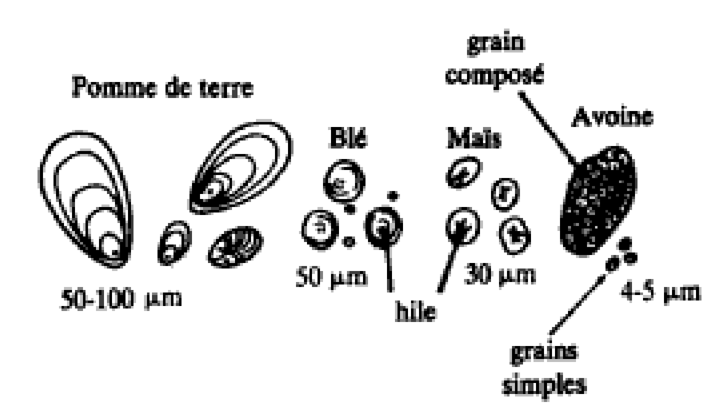


Figure 5.6 Grains d'amidon.

L'*amidon* est insoluble dans les solvants organiques et l'eau froide bien qu'il soit hydrophile. Par agitation avec l'eau, il se forme une suspension instable appelée lait d'amidon qui, chauffée vers 70 °C, devient visqueuse et translucide ; au cours du chauffage les grains d'amidon s'hydratent, gonflent formant ainsi un gel, l'*empois d'amidon.* Ce gel peut rétrograder, sa viscosité diminue ; il se fluidifie puis précipite. La rétrogradation est un inconvénient pour certaines préparations industrielles et alimentaires (colles et pâtes). Enfin, par un traitement mécanique ou chimique convenable de l'amidon naturel on prépare une variété dite soluble utilisée en analyse.

• **Structure.** — L'hydrolyse acide totale, relativement longue, ne fournit que du glucose ; l'hydrolyse enzymatique par une amylase conduit principalement au maltose : l'amidon est donc un *polyglucose riche en liaisons* $1 \rightarrow 4$. L'étude de ses propriétés (pouvoir réducteur, dérivés méthylés, etc.) et son fractionnement ont permis de mettre en évidence deux constituants : l'*amylose* et l'*amylopectine.*

— L'**amylose** est formée de chaînes de 250 à 300 résidus d'αD-glucopyranose associés par des liaisons osidiques $1 \rightarrow 4$, elle est donc équivalente à un enchaînement

cellulose, associée à des substances variées, organiques (composés pectiques, lignine, hémi-celluloses, cires, etc.) ou minérales (carbonate de calcium, silice), entre pour une part importante dans la composition des membranes végétales, véritables parois squelettiques rigides.

Cette substance blanche et fibreuse est insoluble dans les solvants usuels y compris l'eau, bien qu'elle soit hydrophile. Elle se dissout dans la *liqueur de Schweitzer,* solution ammoniacale d'hydroxyde cuivrique $\left(\left[Cu\left(NH_3\right)_4\right]^{2+} 2\,OH^-\right)$ d'où l'on peut la faire précipiter par acidification. La cellulose fixe de façon non spécifique de nombreux colorants (carmin aluné, rouge Congo, bleu de toluidine, etc.).

• **Structure.** — La cellulose n'est *pas réductrice.* Elle résiste bien aux alcalis et à la plupart des réactifs chimiques peu énergiques.

L'*hydrolyse chimique,* qui est difficile, peut être réalisée dans les conditions suivantes :

— hydrolyse totale par dissolution de fibres de coton dans l'acide sulfurique concentré, dilution de la solution obtenue et ébullition prolongée. On obtient uniquement du *D glucose* ;

— hydrolyses partielles soit par action d'une solution sirupeuse de chlorure de zinc qui fournit des *hydrocelluloses* colorables en bleu par l'iode, soit par action d'un mélange d'anhydride acétique et d'acide sulfurique *(acétolyse)* qui conduit à des dérivés acétylés du *cellobiose* et d'un triose hydrolysable par une β-glucosidase.

La cellulose est donc un polyglucose formé par un enchaînement de β*D-glucopyrannose* par des *liaisons* 1 → 4 comme le confirme la méthylation.

La molécule de cellulose est une chaîne droite résultant de l'union de 1 500 à 10 000 résidus de β*D*-glucose selon l'origine. La masse moléculaire peut être supérieure à 2×10^6 daltons et la longueur voisine de 1 à 1,5 μ (fig. 5.9).

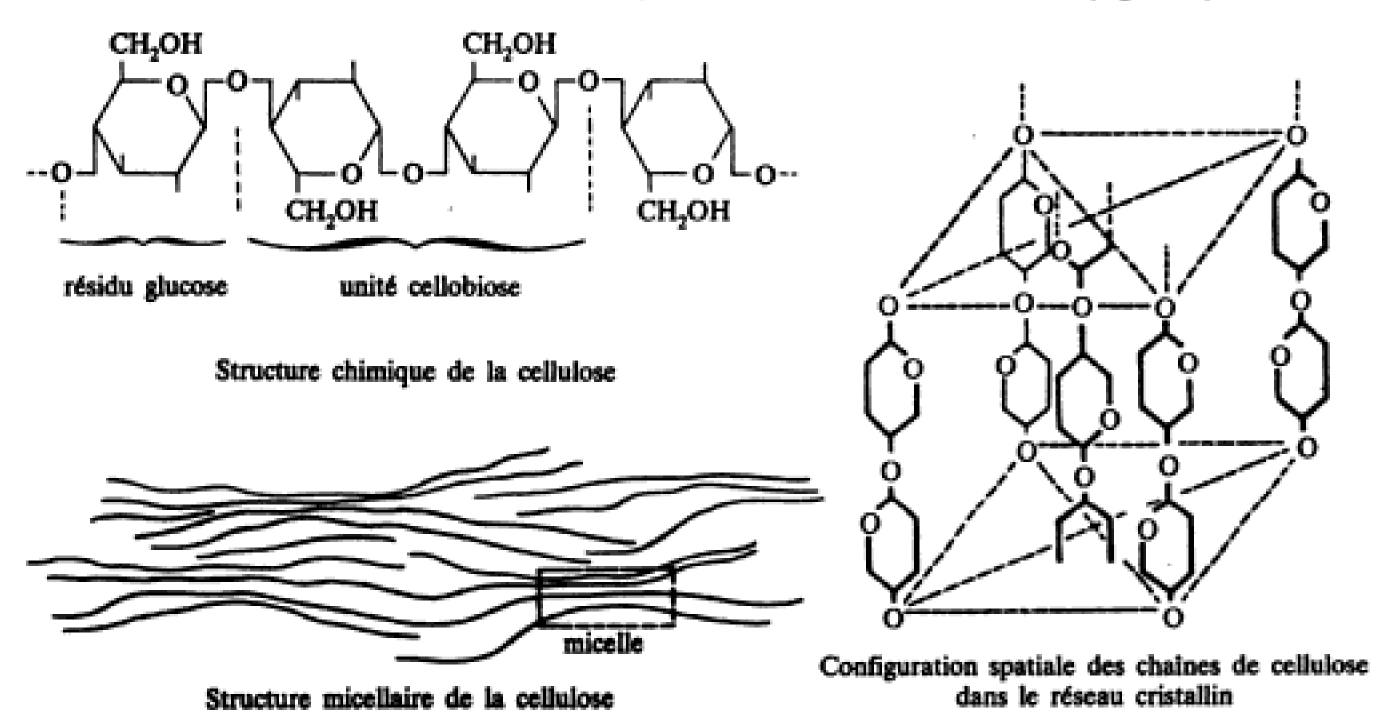


Figure 5.9 Structure de la cellulose.

Les *méthodes optiques* ont permis de montrer que ces macromolécules sont groupées en complexes fibrillaires rigides plus ou moins ordonnés. Dans certaines zones, les chaînes de cellulose, par l'intermédiaire de liaisons secondaires, sont régulièrement disposées constituant une structure microcristalline cubique analysable par les rayons X. Ces secteurs cristallins qui peuvent mesurer 600 Å × 200 Å sont encore appelés micelles (fig. 5.9).

L'assemblage de ces zones représente une microfibrille de cellulose, celui des microfibrilles une fibrille dont le dépôt en couches successives orientées et mélangées au « ciment » organique et minéral constitue la paroi cellulaire des végétaux.

Les cellules végétales allongées, riches en cellulose presque pure à haut degré de polymérisation sont les fibres végétales, de nature chimique différente des fibres animales mais, comme elles, fortement condensées et structurées. De cette structure résultent les propriétés mécaniques particulières : résistance et souplesse.

Ex. : Les poils de la graine du cotonnier qui renferment 98 % de cellulose, les fibres des tiges de lin, de chanvre, de ramie, etc. Industriellement la cellulose est préparée à partir du bois ce qui nécessite une purification plus complexe.

• **Propriétés.** — Dans les conditions naturelles la cellulose est caractérisée par une grande inertie chimique. Les enzymes qui catalysent son hydrolyse en cellobiose, les ***cellulases*** ou ***cytases,*** sont peu répandues. On trouve ce type d'enzymes chez quelques bactéries dites cellulolytiques (bactéries du sol et bactéries intestinales des ruminants), quelques moisissures et champignons, et dans l'hépatopancréas d'escargot. Les sucs digestifs de l'homme en sont dépourvus et de ce fait n'attaquent pas la cellulose.

Cette différence fondamentale de propriétés et de comportement de la cellulose par rapport à l'amidon et au glycogène résulte uniquement de la configuration α et β du glucose engagé dans les liaisons osidiques, ce qui souligne encore l'importance de la structure dans le domaine biologique.

4. AUTRES POLYSACCHARIDES HOMOGÈNES

Outre ces trois exemples, les cellules renferment d'autres polyglucoses ou ***glucosanes,*** moins répandus, qui diffèrent les uns des autres par la forme α ou β du glucose, le nombre de résidus enchaînés et le mode de liaison (1-2, 1-3, 1-6, linéaire ou ramifié).

Ex. : Le ***dextrane,*** excrété dans le milieu de culture notamment par la bactérie *Leuconostoc mesenteroides* est un polysaccharide de masse moléculaire élevée formé d'unités α*D*-glucopyrannose liées en 1 → 6. Le dextrane est employé comme succédané du plasma sanguin.

Les autres polysaccharides homogènes sont classés d'après la nature de l'ose ou du dérivé d'ose polycondensé. On distingue ainsi :

• **Des pentosanes.**

Ex. : Les ***arabanes*** (résidus *L* arabinofurannose liés en 1 → 5) qui entrent dans la composition des matières pectiques.

Les ***xylanes*** qui font partie des hémicelluloses et sont abondants dans les bois durs d'Angiospermes.

• **Des hexosanes.**

Ex. : Les ***galactanes*** font partie des composés pectiques et se rencontrent également chez les animaux.

Les ***mannanes*** sont présents dans les bois de Gymnospermes. Le mannane de l'albumen corné des graines de *corozo* (ivoire végétal) possède la même structure que la cellulose.

Les ***fructosanes*** et les ***lévanes.*** L'inuline, réserve amylacée des racines et tubercules des Composées (Topinambour, Dahlia, etc.) est un mélange de produits de condensation du fructose sous forme furannique. Les molécules sont constituées de 15 à 30 résidus reliés en (2 → 1) avec souvent un résidu glucose à l'extrémité non réductrice de la chaîne.

Les lévanes sont des fructosanes fortement ramifiés et sécrétés par certaines bactéries (*Bacillus subtilis, Aerobacter levanicum,* etc.).

• **Des polyuronides** formés par l'association de résidus d'acides uroniques.

Ex. : Le produit de condensation de l'ester méthylique de l'acide *D*-galacturonique par l'intermédiaire de liaisons α (1 → 4) est un constituant majeur des composés pectiques ou pectines des parois cellulaires. Ce sont des substances très visqueuses, gélifiantes.

• **Des polyosamines.**

Ex. : La ***chitine,*** constituant des carapaces d'Arthropodes, seule ou associée à des protéines et à des substances minérales, résulte de l'enchaînement par des liaisons 1 → 4, de β-glucosamine, acétylée au niveau de sa fonction amine (*N*-acétylglucosamine). L'unité disaccharidique correspondante a reçu le nom de chitobiose.

CH_2OH CH_2OH O O OH O OH OH HO $NHCOCH_3$ $NHCOCH_3$

Chitobiose

B. Les polyholosides mixtes

Ce groupe de composés est mal défini car, d'une part, certains polysaccharides mixtes ne sont sans doute que des mélanges de polysaccharides homogènes non séparés et, d'autre part, il fait transition avec les mucopolysaccharides par association à des fractions protéiques. Ces substances essentiellement végétales entrent dans la composition des gommes et des mucilages et participent à la constitution des enveloppes cellulaires bactériennes et des capsules.

Ex. : La *gomme arabique,* substance qui exsude après écorçage de certains Acacias, fournit à l'hydrolyse de l'acide glucuronique, du galactose, du rhamnose, de l'arabinose.

La *gélose ou agar-agar,* extraite des algues du genre *Gelidium* est riche en *D* et *L* galactose estérifié par l'acide sulfurique.

Le *mucilage de la graine de Lin,* libère lors de son hydrolyse de l'acide galacturonique, du galactose, du rhamnose et du xylose.

Les *acides polyaldobioniques* bactériens renferment des oses, des oses aminés et des acides uroniques.

C. Les mucopolysaccharides

Ce terme désigne un groupe de macromolécules complexes qu'il est difficile de définir et de classer. Parmi les traits communs nous retiendrons :

— l'association à une fraction protéique pour former une substance appelée *mucoprotéine* ou encore *mucoïde.* Selon les classifications, ces différents termes ne sont pas équivalents aussi les désigne-t-on encore sous le terme de *Protéine-Polysaccharides (P-P) ;*

— l'enchaînement par des liaisons $1 \rightarrow 4$ d'unités disaccharidiques, dont la polycondensation conduit à des macromolécules linéaires ;

— la constitution de ces unités dans lesquelles un acide uronique est lié en 1-3 avec un aminosucre (hexosamine) généralement *N* acétylé ou *N* sulfaté.

Tous ces composés, typiquement extracellulaires, sont porteurs de nombreuses charges négatives $\left(-COO^-, -SO_3\right)$ et au pH de la matière vivante ils se comportent comme de volumineux polyanions. Par suite, les liaisons avec les unités protéiques sont du type ionique et de plus ces composés sont des fixateurs de cations, en particulier de calcium.

Les uns sont des produits de sécrétions, les autres interviennent pour une part importante dans la structure de la plupart des tissus conjonctifs.

1. L'ACIDE HYALURONIQUE

Isolé de l'humeur vitrée puis de nombreux autres tissus et liquides biologiques (liquides synovial, pleural, tissus conjonctifs dont le derme), c'est un polymère de l'acide hyalobiuronique. Ce disaccharide est formé par l'association d'acide β-glucuronique et de *N* acétylglucosamine selon une liaison osidique $1 \rightarrow 3$.

COO— CH₂OH COO— CH₂OH
NH—COCH₃ NH—COCH₃

Monomère = acide hyalobiuronique

Acide hyaluronique

Les acides hyaluroniques, dont les macromolécules sont linéaires, diffèrent par leurs masses moléculaires variant de 200 000 à plusieurs millions. Ils ont une grande affinité pour l'eau avec laquelle ils forment des solutions très visqueuses qui dans les organismes maintiennent l'hydratation du milieu extracellulaire, inhibent les phénomènes de diffusion et réduisent les frictions entre les fibres conjonctives. Les acides hyaluroniques libres ou combinés à des protéines constituent la substance interstitielle du tissu conjonctif et le ciment intercellulaire.

Sous l'influence des *hyaluronidases,* enzymes encore appelées *facteurs de diffusion,* l'acide hyaluronique est d'abord dépolymérisé, ce qui diminue rapidement la viscosité, puis secondairement hydrolysé en acide hyalobiuronique. De tels facteurs existent chez divers microorganismes (streptocoques hémolytiques, anaérobies de la gangrène gazeuse, pneumocoques), dans de nombreux venins ainsi que dans les spermatozoïdes dont ils facilitent la pénétration lors de la fécondation. Les hyaluronidases expliquent les dangers de certaines associations microbiennes, les anomalies accompagnant les maladies du collagène (rhumatisme articulaire aigu, polyarthrite), enfin elles sont utilisées en thérapeutique lors de certaines injections dont elles facilitent la résorption.

2. L'ACIDE CHONDROÏTINE-SULFURIQUE

Ce composé extrait du cartilage possède une structure voisine mais la *N* acétylglucosamine est remplacée par la *N* acétylgalactosamine estérifiée par l'acide sulfurique en position 4 ou 6 selon l'origine.

3. L'ACIDE MUCOÏTINE-SULFURIQUE

Il représente la fraction glucidique des mucines et des mucus. Il correspond à un acide hyaluronique dont les hydroxyles en 4 et 6 de la glucosamine seraient estérifiés par l'acide sulfurique.

4. L'HÉPARINE

C'est un polysaccharide riche en groupements $—SO_3^-$ dans lequel la glucosamine n'est plus acétylée mais sulfatée. C'est un anticoagulant naturel qui inhibe la transformation de la prothrombine en thrombine ainsi que l'action de la thrombine sur le fibrinogène.

5. LES MUCOPOLYSACCHARIDES BACTÉRIENS

Ils entrent dans la constitution des parois et des complexes somatiques de certaines bactéries. Sous forme de combinaisons avec des protéines ou des lipoprotéines, ils représentent les constituants antigéniques des bactéries (eux-mêmes n'étant souvent que des haptènes) et participent ainsi à la virulence et à la spécificité sérologique des germes. Bien étudiés dans les capsules de pneumocoques, ces polysaccharides ont permis une classification sérologique dont la détermination

génétique est connue. Leurs structures sont intermédiaires entre celle des polysaccharides mixtes et celle des mucopolysaccharides étudiés ci-dessus :

Ex. :

Pneumocoque du type II : acide *D* glucuronique, *D* glucose, *L* rhamnose ;
Pneumocoque du type IX : acide uronique, *D* glucose, *D* galactose.

Les hétérosides

Ils résultent de la combinaison avec élimination d'une molécule d'eau du groupe réducteur d'un ose ou d'un oside avec une ou plusieurs substances non glucidiques : l'*aglycone*. Dans les hétérosides naturels l'aglycone participe à la liaison osidique soit :

— par un hydroxyle alcoolique ou phénolique : ce sont les *O hétérosides* ;
— par un groupement thiol : ce sont les *S hétérosides* ;
— par un groupement aminé : ce sont les *N hétérosides*.

La présence de la copule non glucidique leur confère des propriétés particulières. Les *O* et les *S* hétérosides sont essentiellement d'origine végétale constituant des substances de déchet ou de réserve souvent localisées dans les vacuoles.

I. LES O HÉTÉROSIDES

A. Hétérosides d'alcools

Il s'agit le plus souvent d'une fonction alcool secondaire appartenant soit à un cycle soit à un nitrile alcool ou cyanhydrine. Dans ce dernier cas, ils sont cyanogénétiques et capables de provoquer des intoxications par suite d'une hydrolyse.

Ex. : — *Hétéroside cyanogénétique* des amandes amères : l'amygdaline ou amygdaloside (2 résidus glucose, 1 mole d'acide cyanhydrique et 1 mole d'aldéhyde benzoïque). L'amygdaloside est hydrolysé par l'émulsine.

— *Hétérosides stéroliques.*

Les saponines, substances tensioactives faisant mousser l'eau. Le digitonoside, qui précipite avec le cholestérol libre, ce qui permet au laboratoire de le séparer de ses esters, est une saponine de la digitale. Les saponines sont douées de propriétés hémolytiques marquées.

Les hétérosides cardiotoniques. La digitaline ou digitoxoside de la digitale,

II. LES S HÉTÉROSIDES

Ils représentent un petit groupe caractéristique des Crucifères.

Ex. : Le *sinigroside* des graines de moutarde noire (glucose, hydrogénosulfate de potassium et isosulfocyanate d'allyle $S{=}C{=}N{-}CH_2{-}CH{=}CH_2$).

III. LES N HÉTÉROSIDES

Ce sont presque exclusivement des dérivés du ribose et du désoxyribose présents dans toutes les cellules animales ou végétales. Leurs esters phosphoriques, appelés nucléotides, sont les monomères constitutifs des acides nucléiques.

Méthodes d'analyse des glucides

Par suite de leur solubilité aqueuse, l'*extraction* des glucides est généralement réalisée à l'aide d'une solution aqueuse à l'ébullition après broyage ou découpage du matériel.

Cette solution doit être en permanence sensiblement neutre pour éviter l'hydrolyse acide ou les isomérisations en milieu alcalin ; elle doit, de plus, être assez dénaturante pour inhiber toute activité enzymatique, ce que l'on réalise par addition d'éthanol. En fait, si la méthode est générale pour les oses et les oligosides, il n'en est pas de même pour les polyosides dont l'extraction pose dans chaque cas des problèmes particuliers. Il est alors souvent nécessaire de faire précéder l'extraction d'une hydrolyse ou d'une dénaturation de manière à libérer la fraction osidique des complexes protéiques ou lipoprotéiques.

La *purification* de l'extrait brut nécessite des opérations de défécation, de délipidation par des solvants convenables ainsi que l'élimination des substances minérales par extraction sélective ou par électrodialyse. La *pureté* de l'extrait n'est en principe prouvée que par la détermination et le dosage des autres constituants présents sous forme d'impuretés (cendres, dosage de l'azote total, absorption

ultraviolette des composés nucléiques à 260 nm, fractionnement par électrophorèse, techniques immunologiques, etc.).

Le *fractionnement* d'un extrait glucidique est toujours difficile et délicat, seules les méthodes chromatographiques ou électrophorétiques sont d'un emploi assez général.

L'identification et le dosage des glucides portent généralement sur des glucides simples (oses et di- ou triholosides) ou sur les produits d'hydrolyse d'un glucide complexe (oligoside, polyoside). Les méthodes sont nombreuses, elles peuvent être physiques, chimiques, ou biologiques.

I. LES MÉTHODES PHYSIQUES

• La **chromatographie** sur papier, sur couche mince *et sur colonne HPLC* est la technique de choix pour l'identification des sucres à l'état de traces. La technique sur résines échangeuses d'ions n'est applicable qu'aux dérivés ionisés, esters boriques par exemple ; il en est de même pour l'électrophorèse. Ce fractionnement peut être suivi d'un microdosage colorimétrique.

• La **polarimétrie** est également très utilisée, elle permet : soit la mesure d'un pouvoir rotatoire spécifique à partir d'une solution pure du glucide, soit le dosage d'un sucre ou d'un mélange de deux et parfois trois sucres en solution.

• Les **autres méthodes physiques,** détermination de points de fusion, densimétrie, réfractométrie, viscosimétrie sont d'un emploi beaucoup plus limité.

II. LES MÉTHODES CHIMIQUES

• Les **méthodes basées sur les propriétés réductrices,** applicables directement aux oses et aux osides réducteurs et après hydrolyse aux osides non réducteurs, ne permettent pas d'identification. Par contre elles sont utilisées dans de nombreux dosages et lors de la recherche de la présence anormale d'un sucre réducteur dans un liquide biologique, urine par exemple.

• **Les méthodes basées sur la formation de dérivés colorés** caractéristiques ont perdu beaucoup de leur intérêt depuis l'introduction des techniques chromatographiques. Les réactions colorées, comme les réactions furfuraliques, anciennement utilisées pour caractériser la présence d'un type d'ose (hexose ou pentose, aldose ou cétose) et pour les dosages ne servent plus guère de nos jours qu'à la révélation des chromatogrammes et à quelques applications particulières (détermination de la glycémie).

• La **formation de dérivés insolubles** facilement identifiables, tels que les osazones, qui rendent possible l'identification d'un sucre réducteur en tenant compte des réserves formulées lors de leur étude, n'est plus d'un dosage courant.

III. LES MÉTHODES BIOLOGIQUES

Nous retiendrons la réaction colorée à la glucose-oxydase qui est un moyen simple, rapide et spécifique de détecter la présence de glucose. Elle peut être adaptée à des fins quantitatives.

Les méthodes enzymatiques à l'hexokinase et à la glucokinase sont les méthodes de dosage du glucose les plus spécifiques.

Les glycoprotéines

Les *glycoprotéines* ou *mucoprotéines* sont des associations de protéines et de glucides plus ou moins fortement polymérisés. Elles constituent un ensemble de composés dont la structure, la répartition et le rôle structural ou fonctionnel apparaissent chaque jour plus extraordinaire.

Nos connaissances actuelles, en pleine évolution, sont encore imparfaites d'où une certaine confusion dans la nomenclature et la classification. Les difficultés de l'analyse des glycoprotéines résultent de leur complexité et de leur parenté chimique qui rendent délicats l'isolement et la purification, ainsi que du danger d'artefacts (rupture des macromolécules, formation de liaisons n'existant pas *in situ*, etc.).

Les fractions glucidiques sont représentées par des chaînes courtes fixées latéralement, par l'intermédiaire de *liaisons covalentes,* sur la séquence polypeptidique. Elles représentent jusqu'à 40 % de la molécule.

Les constituants glucidiques comprennent :

• des oses : *D* xylose, *D* galactose, *D* mannose, *L* rhamnose, *L* fucose. Le *D* glucose est rare, présent seulement dans les glycoprotéines de structure ;

• des hexosamines acétylées : *N* acétylglucosamine et *N* acétylgalactosamine ;

• des dérivés acétylés de l'acide neuraminique ou acides sialiques.

Les chaînes glucidiques ont une structure d'oligosaccharide et sont liées à la protéine :

— par des liaisons osidiques incluant le groupement réducteur de la chaîne.

Ex. :

liaison avec les hydroxyles de la sérine ou de la thréonine (liaison O glycosidique) ;

liaison avec la fonction amide de l'asparagine ou de la glutamine (liaison *N* glycosidique).

— plus rarement par une liaison peptidoïde (fonction amine de l'hexosamine et carboxyle terminal de l'acide aspartique ou glutamique).

Le nombre de chaînes glucidiques par molécule de glycoprotéine est très variable depuis une seule (ribonucléase β, ovalbumine) jusqu'à 800 (glycoprotéine des glandes salivaires de mouton soit 1 chaîne pour 6 résidus d'acides aminés).

Les glycoprotéines par suite de leur teneur en acides sialiques ayant leurs groupements carboxyliques libres présentent un caractère acide net (pH_i faible, grande solubilité aqueuse à la neutralité, mobilité électrophorétique).

Les glycoprotéines sont très répandues dans les tissus animaux, on les trouve également chez les végétaux et les micro-organismes. Quelques exemples peuvent nous convaincre de leur importance :

— glycoprotéines des tissus conjonctifs et des espaces intercellulaires ;

— mucines des sécrétions (urine, lait, liquide duodénal et sécrétions muqueuses diverses) ;

— glycoprotéines sériques : orosomucoïde, haptoglobines, séromucoïdes, prothrombine, céruloplasmine, transferrine, etc. ;

— glycoprotéines des groupes sanguins, agglutinogènes des hématies ;

— glycoprotéines hormonales (hormone lutéinisante, folliculostimulante, chorionique) ou enzymatiques (cholinestérase, peroxydase), etc.

Enfin de nombreuses protéines ont une teneur en glucides inférieure à 5 % et sont alors considérées comme des holoprotéines. *Ex.* : ovalbumine, γ globulines, fibrinogène, etc.

6
Les acides nucléiques

C'est le biologiste allemand F. Miescher qui le premier, de 1868 à 1872, isola des noyaux des cellules du pus des composés azotés et phosphorés renfermant environ 10 % de phosphore. D'abord appelés *substances nucléiques* ou *nucléines,* puis ***acides nucléiques,*** ces constituants cellulaires furent l'objet de nombreux travaux durant la fin du XIX[e] et la première moitié du XX[e] siècle. Ainsi, progressivement, s'établirent les notions suivantes.

— Les acides nucléiques sont des constituants universels de la matière vivante dont ils représentent 10 à 20 % du poids sec.

— Ces composés, de caractère acide, doivent être répartis en deux catégories d'après leur constitution :

• Les **acides désoxyribonucléiques (ADN*),** essentiellement localisés dans le noyau cellulaire.

• Les **acides ribonucléiques (ARN*),** plus abondants dans le cytoplasme.

Les acides nucléiques sont le plus souvent associés à des fractions protéiques variées pour former des protéines conjuguées : *les nucléoprotéines.*

I. COMPOSITION DES ACIDES NUCLÉIQUES

A. Les constituants

L'hydrolyse totale d'un acide nucléique purifié permet de déceler trois types de constituants :

l'***acide o-phosphorique, un pentose, des bases azotées.***

• L'**acide o-phosphorique** H_3PO_4 est commun à tous les acides nucléiques. La détermination de la teneur en phosphore représente d'ailleurs un bon critère de pureté pour ces composés.

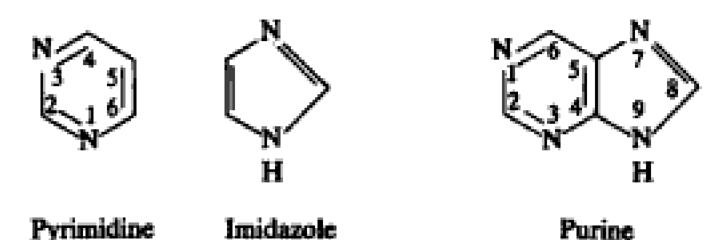
• Le **pentose** diffère selon la catégorie d'acides nucléiques.

C'est le $\beta D(-)$ *ribofurannose,* caractérisé par la réaction de **Bial** à l'orcinol, pour les acides ribonucléiques et le $\beta D(-)$ *2 désoxyribofurannose,* mis en évidence par les réactions colorées à la diphénylamine et à la fuschine bisulfitée (réaction de **Feulgen**) pour les acides désoxyribonucléiques.

(*) Les sigles DNA et RNA correspondent à l'abréviation de la dénomination anglo-saxonne.

• Les **bases azotées**, qui sont des dérivés oxygénés, aminés ou méthylés d'hétérocycles azotés à caractère plus ou moins basique, sont réparties en deux séries :

La série pyrimidique dérive d'un hétérocycle à 4 atomes de carbone et 2 atomes d'azote : la pyrimidine.



Pyrimidine Imidazole Purine

La série purique est issue de la purine résultant elle-même de la condensation de deux hétérocycles azotés, les noyaux pyrimidine et imidazole.

Les bases pyrimidiques sont des oxypyrimidines. Trois d'entre elles sont abondantes, ce sont :

— la ***cytosine*** (2-oxy-4-aminopyrimidine) présente aussi bien dans les ADN que dans les ARN ;

— l'***uracile*** (2-4-dioxypyrimidine) présente exclusivement dans tous les ARN ;

— la ***thymine*** (2-4-dioxy-5-méthylpyrimidine ou 5-méthyluracile) que l'on rencontre presque exclusivement dans tous les ADN.

Cytosine (C) Uracile (U) Thymine (T)

A ces trois exemples, il convient d'ajouter des bases pyrimidiques rares, présentes seulement dans quelques types d'acides nucléiques et en quantité réduite.

Ex. : 5 méthylcytosine, 5 hydroxyméthylcytosine, 5 hydroxyméthyluracile, etc.

Les bases puriques sont des aminopurines. — Les deux catégories d'acides nucléiques renferment les deux mêmes bases puriques : l'***adénine*** (6-aminopurine) et la ***guanine*** (2-amino-6-oxypurine).

Adénine (A) Guanine (G) Hypoxanthine (H)

Mais les dérivés puriques naturels sont nombreux. Outre ces deux exemples, on peut citer : des bases. ***Ex.*** : l'*hypoxanthine* (6-oxypurine), les *dérivés méthylés de l'adénine et de la guanine ;* des produits de leur métabolisme. ***Ex.*** : la *xanthine* (2-6-

nucléosides. Chaque nucléoside est désigné par un nom commun à terminaison *osine* s'il est purique et *idine* s'il est pyrimidique, la liaison N glycosidique étant d'ailleurs plus stable pour les dérivés pyrimidiques. Les principaux d'entre eux, compte tenu de la répartition des pentoses et des bases, figurent dans le tableau V.

2. LES NUCLÉOTIDES

Ce sont les esters phosphoriques de nucléosides.

Les *mononucléotides*, qui représentent les véritables monomères de ce groupe, doivent être considérés, malgré certains résultats analytiques, comme des esters de la fonction alcool primaire de l'ose ou *esters-5'-phosphates.* Leur nomenclature et les abréviations sont précisées dans le tableau V ci-dessous pour les bases les plus courantes.

Ex. :

Adénosine-5'-monophosphate

Désoxycytidine-5'-monophosphate

Les *polynucléotides* résultent de l'enchaînement de nucléotides 5'-monophosphates par des liaisons esters. La fonction alcool en 3' de l'un est estérifiée par

Tableau V. Principaux constituants des acides nucléiques.

	Bases azotées	Nucléosides	Nucléotides
Acides ribo-nucléiques (ARN) pentose : ribose	Cytosine : *C* Uracile : *U* Adénine : *A* Guanine : *G*	Cytidine : *C* Uridine : *U* Adénosine : *A* Guanosine : *G*	Cytidine-5'-monophosphate : *CMP* Uridine-5'-monophosphate : *UMP* Adénosine-5'-monophosphate : *AMP* Guanosine-5'-monophosphate : *GMP*
Acides désoxyribo-nucléiques (ADN) pentose : désoxyribose	Cytosine : *C* Thymine : *T* Adénine : *A* Guanine : *G*	Désoxycytidine : *dC* Désoxythymidine : *dT* Désoxyadénosine : *dA* Désoxyguanosine : *dG*	Désoxycytidine-5'-monophosphate : *dCMP* Désoxythymidine-5'-monophosphate : *dTMP* Désoxyadénosine-5'-monophosphate : *dAMP* Désoxyguanosine-5'-monophosphate : *dGMP*

Les enzymes de restriction sont les outils qu'utilisent les généticiens pour découper l'ADN, pour l'analyser ou pour fabriquer des vecteurs destinés à transformer des bactéries.

Actuellement une centaine d'enzymes de restriction ont été purifiées.

II. LES ACIDES DÉSOXYRIBONUCLÉIQUES

La condensation des nucléotides en acides nucléiques n'est pas sans rappeler celle des amino-acides en protéines et pose des problèmes de structure analogues et souvent même plus complexes.

A. Structure des acides désoxyribonucléiques ou ADN

Les acides désoxyribonucléiques résultent de la condensation de désoxyribonucléotides-5'-monophosphates dans lesquels les bases sont presque exclusivement l'adénine, la guanine, la cytosine et la thymine. Soit au total quatre monomères (dAMP, dGMP, dCMP, dTMP).

La découverte de la structure des ADN résulte de l'association de trois moyens d'investigation. Le premier, d'ordre théorique et général, est basé sur des considérations énergétiques et stériques (position des atomes, nature et orientation des liaisons dans l'espace moléculaire). Le second est analytique et représente un travail considérable. Il consiste à hydrolyser un ADN purifié, cristallisé, puis à séparer et à doser les diverses bases azotées par spectrophotométrie et ceci pour différentes espèces, allant des virus, aux micro-organismes puis à l'homme et pour différents tissus, thymus, foie, pancréas, spermatozoïdes, etc. Le troisième est physique et correspond à l'analyse des clichés de diffraction des rayons X émergeant d'une fibre d'ADN.

A partir de ces données, Watson et Crick proposèrent une structure moléculaire en double hélice qui a été confirmée par des travaux ultérieurs et semble bien correspondre à l'état réel de l'ADN cellulaire. Plutôt que d'étudier successivement les différents arguments qui ont conduit à cette forme moléculaire, nous partirons de cette structure et nous montrerons comment elle permet d'expliquer les résultats analytiques et les comportements de l'ADN.

1. LA DOUBLE HÉLICE

La molécule d'ADN est formée par l'enroulement hélicoïdal régulier et dextrogyre, autour d'un axe commun de deux chaînes de polydésoxyribonucléotides. Son pas sur l'axe est constant (34 Å) et elle s'inscrit dans un cylindre de 20 Å de diamètre (fig. 6.2). Cette structure est dite encore bicaténaire.

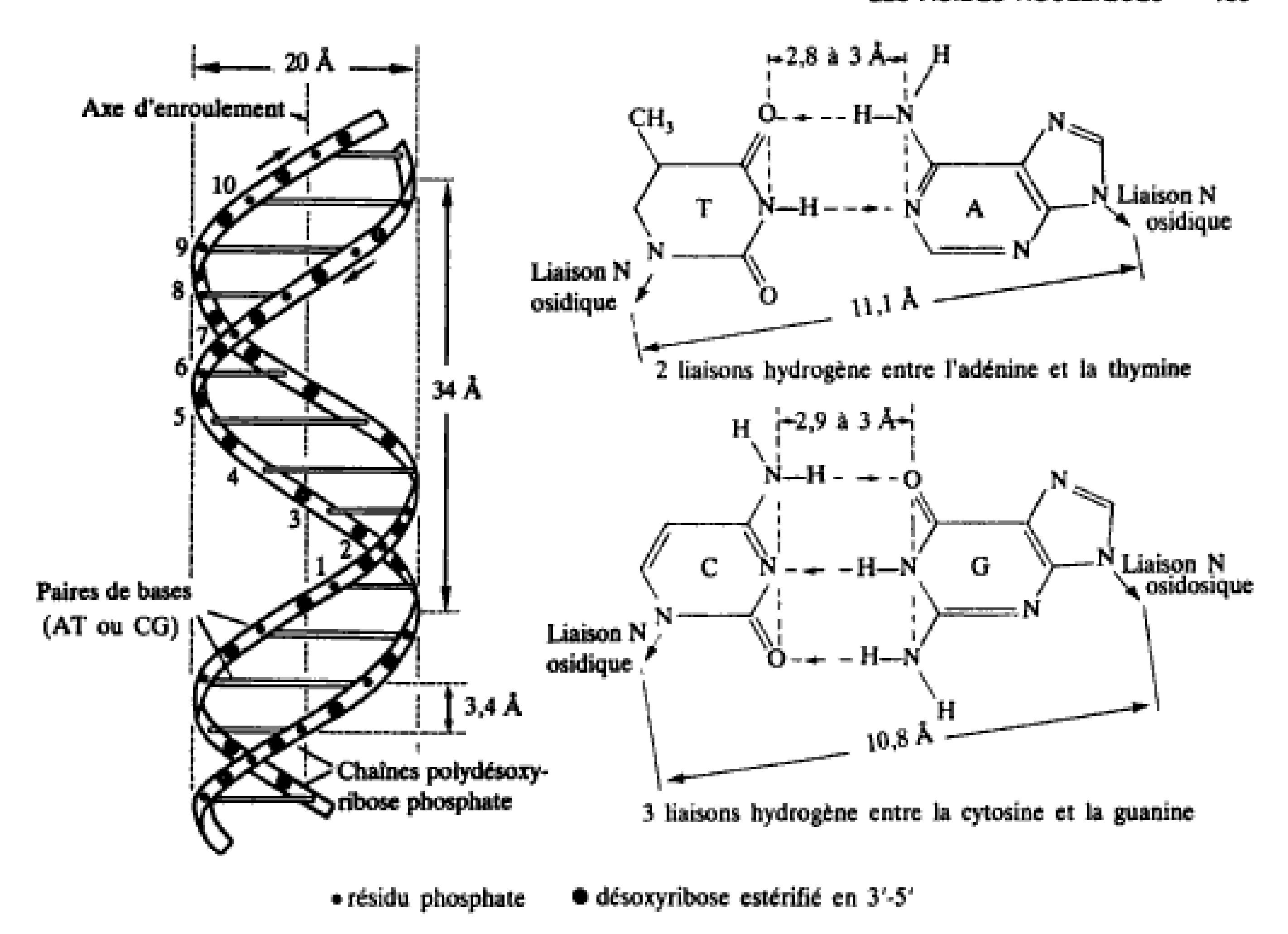


Figure 6.2 Représentation simplifiée de la double hélice d'ADN et détail des couplages de bases par liaisons hydrogène.

• **Le diamètre constant de cette macromolécule** tient au mode d'assemblage des bases.

L'analyse chromatographique des produits d'hydrolyses d'acides désoxyribonucléiques révèle :

— *une permanence quantitative de l'ADN total par noyau cellulaire ainsi qu'une fixité de la composition en bases azotées pour tous les types cellulaires d'une espèce donnée.*

Ainsi en ce qui concerne l'ADN bovin, les tissus somatiques diploïdes (cœur, rein, thymus, etc.) renferment une quantité voisine de 6,4 . 10^{-6} µg par noyau. Par ailleurs la composition en bases est relativement constante.

Origine de l'ADN	Bases azotées							
	A	G	C	T	5 methyl-C	A/T	G/C	$\frac{A+T}{G+C}$
Thymus bovin	28,2	21,5	21,2	27,8	1,3	1,01	0,96	1,3
Rate bovine	27,9	22,7	20,8	27,3	1,3	1,02	1,02	1,25
Sperme bovin	28,7	22,2	20,7	27,2	1,3	1,05	1,01	1,26

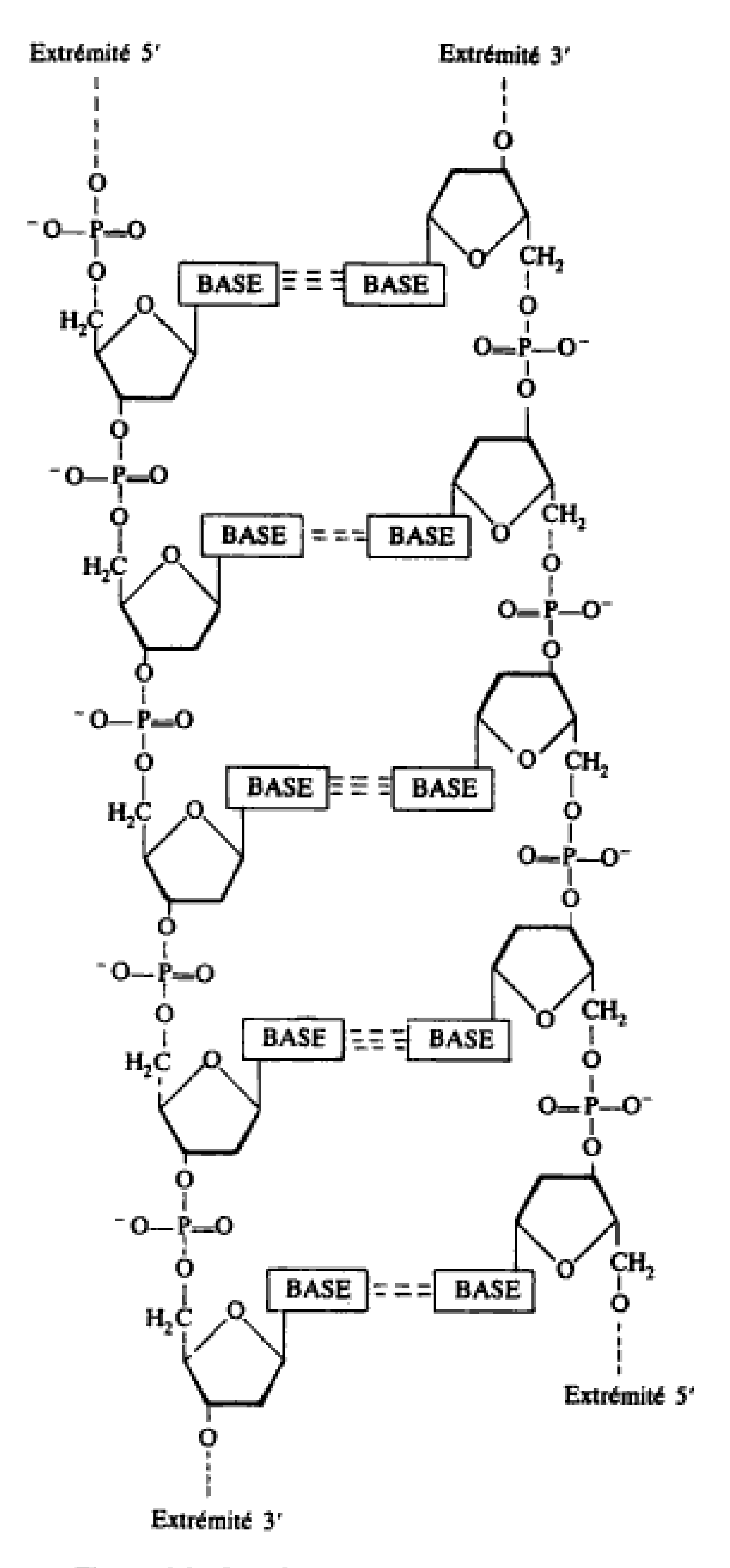


Figure 6.3 Les deux chaînes antiparallèles de l'ADN.

— *Une équimolarité des bases A et T d'une part et C et G d'autre part* pour tous les ADN quelle que soit leur origine systématique (cependant le phage ∅ × 174 fait exception). Les bases sont en effet réparties par paires ou dyades *(A-T)*, *(C-G)*. On dit encore que *A* et *T* sont complémentaires, de même que *G* et *C*. L'assemblage entre deux **bases complémentaires**, qui s'affrontent dans un même plan transversal, se réalise dix fois par spire. Chaque dyade est, par suite, distante de ses voisines de 3,4 Å et décalée par rapport à elles de 36° ; de plus, il en résulte un diamètre sensiblement constant pour l'hélice (20 Å).

La complémentarité des bases puriques et pyrimidiques est indispensable à la formation des *liaisons hydrogène* internes donc à la stabilité de la molécule. En effet, les deux chaînes de polydésoxyribose-phosphate, polyanioniques, qui ont tendance à se repousser sont maintenues par des attractions hydrophobes et des liaisons hydrogène spécifiques entre les bases complémentaires (fig. 6.2). La rupture de ces liaisons, qui est facile par suite de leur faible énergie, entraîne la dissociation des chaînes. Cette complémentarité, qui impose que les deux chaînes d'une hélice soient orientées en sens opposé l'une par rapport à l'autre *(chaînes antiparallèles)*, conditionne également la répartition des bases. En d'autres termes, la séquence d'une chaîne par suite de la spécificité des liaisons *(A-T)* et *(C-G)* détermine la séquence de l'autre chaîne. Ces résultats ont été confirmés par des analyses séquentielles d'ADN.

• La **longueur de cette molécule d'ADN** qui dépend du nombre de nucléotides enchaînés c'est-à-dire de la masse moléculaire est difficile à préciser. D'une part, si l'ADN viral et bactérien n'est généralement constitué que d'une seule molécule, il n'en est pas de même pour l'ADN provenant des noyaux d'organismes supérieurs et le produit extrait et purifié est un mélange. D'autre part, la molécule d'ADN est fragile et les manipulations nécessaires à la préparation peuvent provoquer des ruptures de chaînes, si bien que les valeurs généralement données, comprises entre 10^6 et 10^7 daltons, sont sans doute trop faibles. D'autres méthodes qui permettent d'estimer le nombre de nucléotides présents suggèrent des masses moléculaires supérieures à 10^9 daltons. Quoi qu'il en soit, il s'agit toujours de macromolécules de masses moléculaires assez homogènes et de longueurs supérieures au millimètre ou au centimètre en les supposant étirées.

On estime que l'ADN d'*Escherichia coli* a environ 1,1 à 1,4 mm de long ce qui correspond à $35 \,.\, 10^5$ paires de nucléotides pour une masse moléculaire de 2 à $3 \,.\, 10^9$ daltons (p. 205). L'ADN contenu dans un spermatozoïde humain représente vraisemblablement 10^9 paires de nucléotides. Il est divisé en chromosomes et comporte de nombreux replis, il y a une molécule d'ADN par chromosome.

2. LA SÉQUENCE DES BASES

Traduite par le rapport $\dfrac{A + T}{C + G}$ ou coefficient de Chargaff, elle est constante pour une espèce donnée et est à l'origine de la diversité des ADN selon les espèces. Cette séquence n'est pas connue dans son ensemble et cela se comprend si l'on pense qu'à une masse moléculaire de 1×10^6 daltons correspond une chaîne de

3 000 nucléotides. Les résultats obtenus font toutefois ressortir qu'elle n'est pas périodique mais *arythmique* (*). La répartition des bases n'est pas la répétition d'un motif fondamental, elle renferme un « *contenu d'information* », ce qui est confirmé par l'étude de la synthèse protéique. Les deux chaînes d'une double hélice ont d'ailleurs, en vertu de la complémentarité, des contenus d'information différents mais équivalents.

B. Propriétés des acides désoxyribonucléiques

1. SOLUBILITÉ

Les sels de sodium des ADN sont solubles dans l'eau en formant des solutions d'une viscosité élevée. Ils sont précipitables par l'éthanol.

2. ABSORPTION ULTRAVIOLETTE

Du fait de la présence des bases puriques et pyrimidiques, les ADN absorbent les radiations ultraviolettes dans la zone de 260 nm (fig. 6.1). L'absorption, bien que très importante (20 à 30 fois supérieure à celle des protéines pour une même concentration), est nettement inférieure à celle que l'on obtiendrait avec un mélange des bases aux mêmes concentrations. On donne à ce phénomène le nom d'*effet hypochrome*. Cette diminution de l'absorption d'environ 30 % résulte de l'assemblage des bases azotées par les liaisons hydrogène.

Cette interprétation a été confirmée par l'étude de chaînes polynucléotides artificielles préparées par polycondensation d'un seul type de nucléotide.

3. DÉNATURATION THERMIQUE

Si l'on chauffe progressivement une solution aqueuse diluée d'un ADN extrait avec le maximum de précautions *(ADN natif)* et que l'on suive les variations de l'absorbance à 260 nm au fur et à mesure de l'élévation de température, on constate alors une brusque augmentation de l'absorption appelée *effet hyperchrome* dans une zone restreinte de température, entre 80 et 100 °C selon les ADN. Il y a en même temps diminution de la viscosité de la solution.

Par analogie, la courbe obtenue est appelée *courbe de fusion* de l'ADN, bien que le phénomène soit très différent d'une fusion, et le point moyen, dont la température dépend de l'ADN traité, a reçu le nom de *point de fusion* pour rappeler l'aspect brutal du phénomène.

Le « point de fusion » de l'ADN 1 est égal à 78 °C, celui de l'ADN 2 est égal à 87 °C. La teneur en couples *GC* de l'ADN 2 est supérieure à celle de l'ADN 1, les deux brins de l'ADN 2 sont plus difficiles à séparer car il existe 3 liaisons hydrogène entre une paire de bases *GC* et 2 seulement entre une paire de bases *AT*.

(*) Il existe cependant dans l'ADN des eucaryotes plusieurs copies de certains gènes (p. 207).

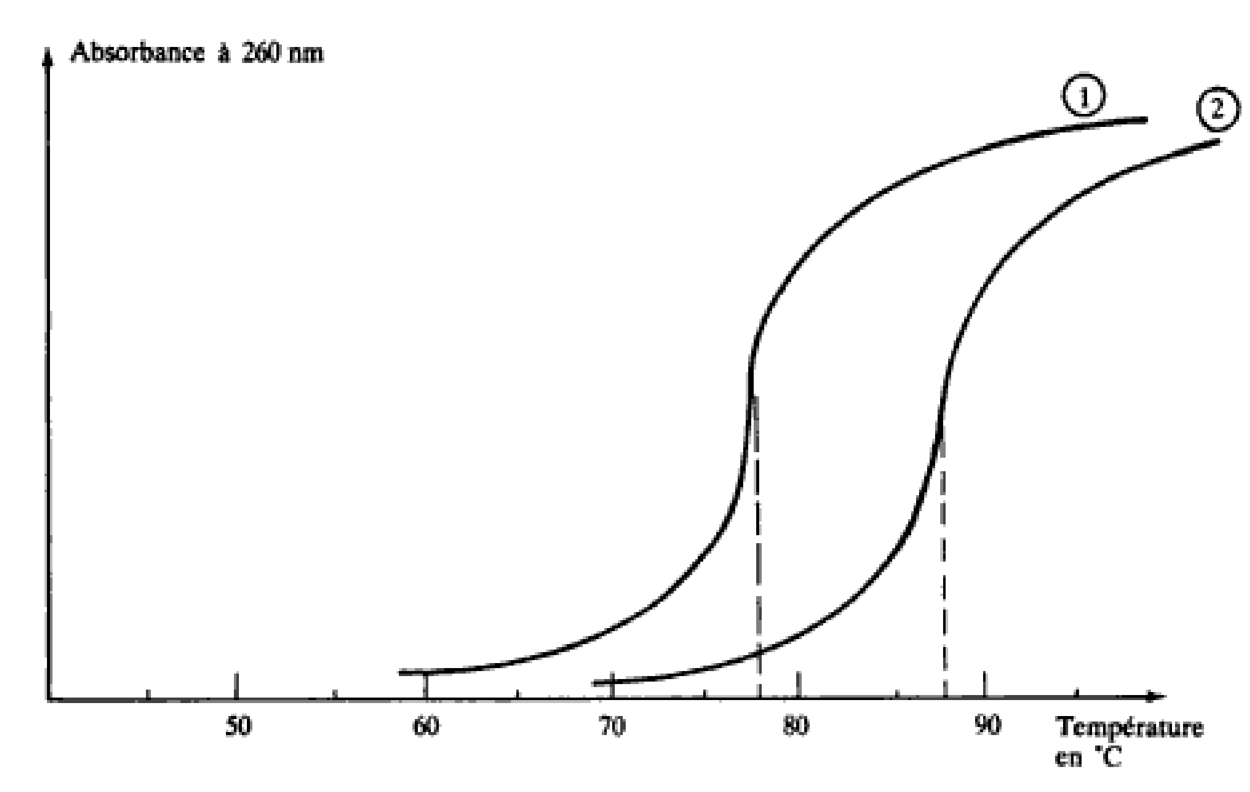


Figure 6.4 Courbes de fusion d'ADN.

L'augmentation d'absorbance à 260 nm de l'ADN dénaturé est due aux bases azotées qui ont un coefficient d'extinction moléculaire plus élevé sous forme libre que sous forme appariée, liée par des liaisons hydrogène à une autre base (p. 199).

La fusion correspond à la rupture des liaisons hydrogène sous l'effet de l'agitation thermique, ce qui a pour conséquence de désaccoupler les bases et de déspiraliser totalement chaque chaîne de la double hélice native. L'ADN devenu *monocaténaire* est dit *dénaturé* (fig. 6.5).

A partir de ce stade dénaturé deux évolutions sont possibles.

• Si le **refroidissement** est **progressif,** on assiste à un retour à l'absorption UV et à la masse moléculaire du produit natif. L'ADN est dit alors *renaturé*, les bases complémentaires se sont réassociées par paires, la structure en double hélice et les propriétés biologiques sont rétablies. En fait, la renaturation n'est totale que si l'ADN n'est formé que d'un type de molécule (ADN bactérien ou ADN des virus à ADN). On conçoit que la dénaturaion ayant séparé et mélangé les chaînes complémentaires, la recombinaison devienne plus aléatoire (possibilité d'assemblage partiel de deux chaînes voisines mais non complémentaires, assemblage de deux zones d'une même chaîne créant une boucle).

• Si le **refroidissement** est **brusque,** les chaînes sont « **trempées** » et demeurent dans cet état, au moins pendant un certain temps car lentement les zones complémentaires se réassocient pour régénérer l'hélice initiale. Le phénomène peut être activé par une nouvelle fusion et un refroidissement progressif.

L'existence de cette renaturation spécifique permet :

— de confirmer la validité de la notion de double hélice qui correspond bien à la forme thermodynamiquement la plus stable en solution ;

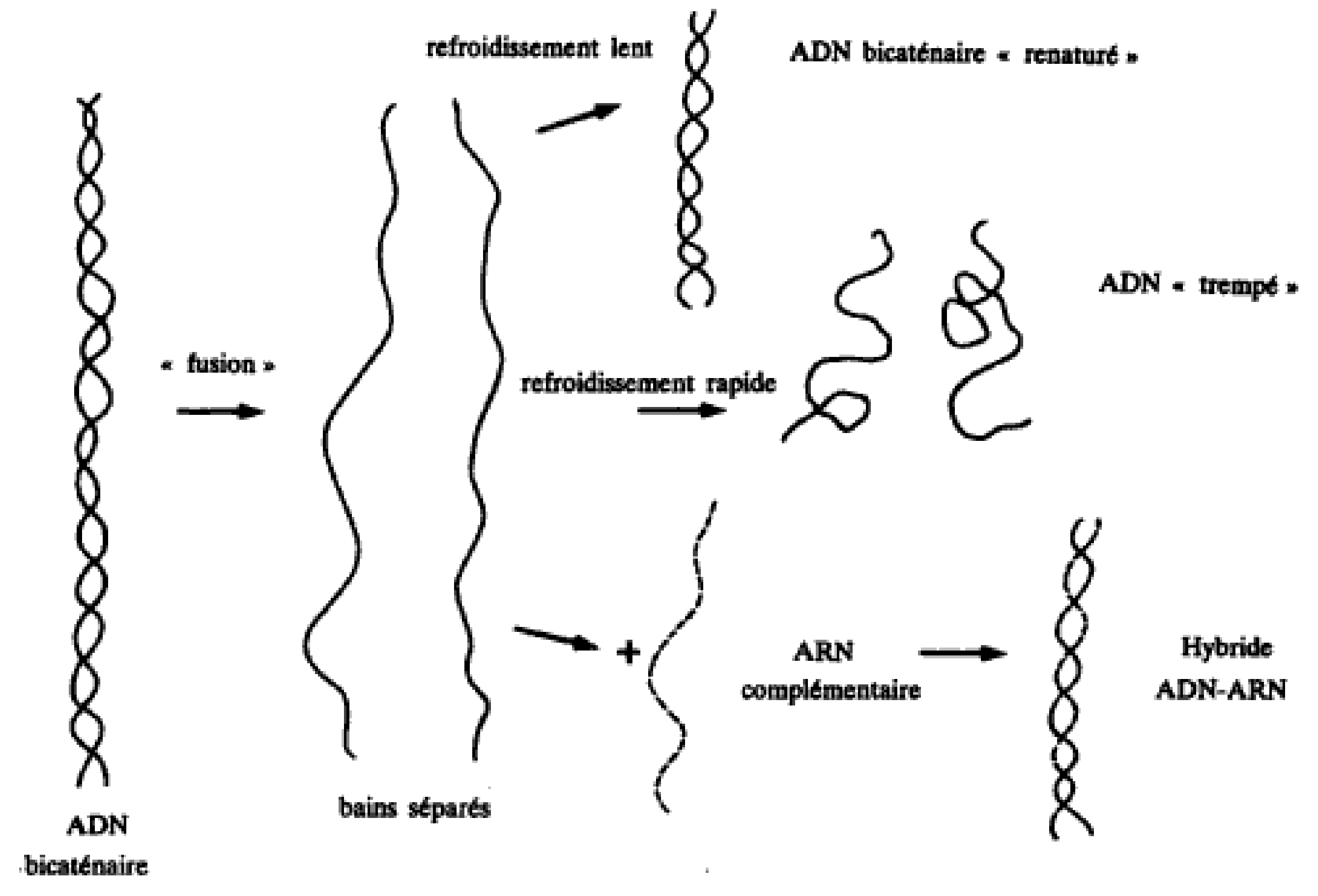


Figure 6.5 Dénaturation thermique de l'ADN.

— de concevoir les phénomènes qui se déroulent lors de la synthèse des ADN et des ARN, les liaisons hydrogènes ayant la possibilité de se créer et de se rompre continuellement vers 30 °C ;

— d'obtenir des *acides nucléiques hybrides* (fig. 6.5) : ADN hybrides provenant du mélange de chaînes appartenant à des espèces voisines, pour lesquelles les séquences sont suffisamment analogues afin de permettre une complémentarité partielle, ADN-ARN hybrides à partir d'un ARN et d'une chaîne d'ADN. Ces hybrides permettent d'étudier les complémentarités de structure des deux types d'acides nucléiques ;

— d'apprécier l'état moléculaire de l'acide nucléique en déterminant le coefficient d'absorption rapporté à la mole d'atomes de phosphore : $\varepsilon(\mathrm{P})$.

$$\varepsilon(\mathrm{P}) = \frac{\text{D.O. à 260 nm} \times 31}{c \times l}$$

avec c = concentration de la solution d'acide nucléique et l = l'épaisseur de solution traversée.

Une valeur anormalement élevée de ce coefficient traduit une dénaturation partielle de l'acide nucléique.

La stérilisation par la chaleur, de même que la fragmentation ou l'action de nombreux réactifs chimiques n'annihilent pas l'activité biologique des acides



4. L'ADN DES CELLULES EUCARYOTES

L'essentiel de l'ADN cellulaire est dans le noyau, plus spécialement porté par les chromosomes, une très faible fraction étant par ailleurs localisée dans le cytoplasme, dans les mitochondries et les chloroplastes.

Les ADN des noyaux sont liés à des protéines pour former une association nucléoprotéique appelée chromatine.

La fraction protéique est composée de protéines, de faible masse moléculaire, et de caractère basique très net : les histones.

La basicité des histones est due à la forte proportion de résidus d'aminoacides basiques, un sur quatre est une lysine ou une arginine et porte une charge positive.

Il n'existe qu'une molécule d'ADN par chromosome d'eucaryote, la longueur de cette molécule, est de 5 cm sous forme linéaire. La structure du filament de chromatine est comparable à un collier de perles, des petites sphères appelées nucléosomes sont reliées les unes aux autres par de l'ADN lien.

Le nucléosome est une association d'ADN et d'histones.

Il existe deux groupes d'histones, le premier désigne quatre protéines : H_2A, H_2B, H_3 et H_4, qui entrent dans la structure du nucléosome, le second est représenté par une protéine H_1, située en périphérie sur le nucléosome et dont le rôle n'est pas clairement établi, peut-être associe-t-elle les nucléosomes entre eux en une superstructure encore plus condensée.

Le nucléosome proprement dit est constitué de 8 sous-unités d'histones (2 de chaque type H_2A, H_2B, H_3 et H_4) associées à une portion d'ADN nucléaire d'environ 140 paires de bases de long.

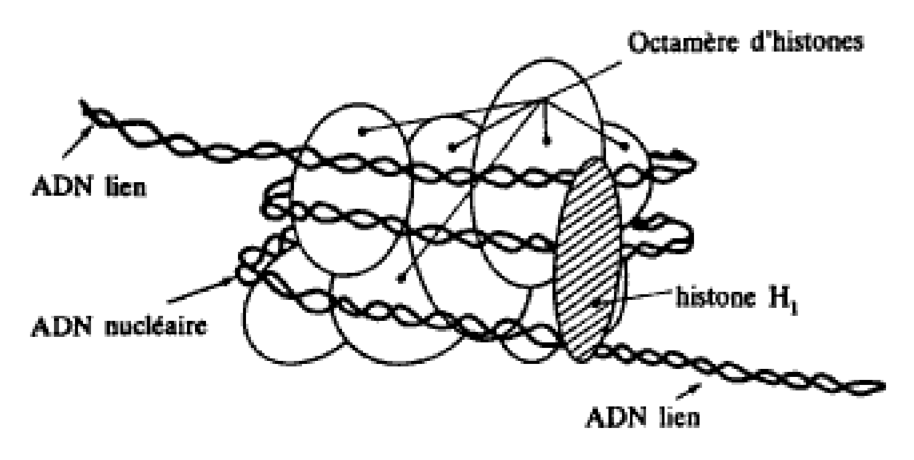


Figure 6.8 Structure schématique d'un nucléosome.

Une démonstration expérimentale récente a prouvé qu'il existe des séquences répétitives dans l'ADN des eucaryotes alors qu'il n'en existe pas chez les procaryotes.

Ceci suggère l'idée qu'il existe, pour certains d'entre eux, plusieurs copies d'un même gène — parfois quelques centaines — ce qui correspond à une extraordinaire amplification de ces gènes polyreprésentés.

Une expérience d'hybridation a permis d'établir que les gènes des eucaryotes avaient une structure discontinue, certaines séquences de l'ADN du gène ne s'apparient pas à l'ARN messager (*) ; on les appelle introns.

Ces introns forment des boucles que l'on a pu voir au microscope électronique.

Les séquences d'ADN intercalées entre les introns s'appellent exons.

Les exons sont complémentaires de l'ARNm (*), ce qui prouve qu'ils codent cet ARN.

La synthèse des ARNm, chez les eucaryotes, se fait en deux temps : un ARN pré-messager est d'abord formé, copie exacte de l'ADN, puis une étape de maturation intervient — qui consiste en l'élimination des introns et au raboutage des exons pour former l'ARNm définitif.

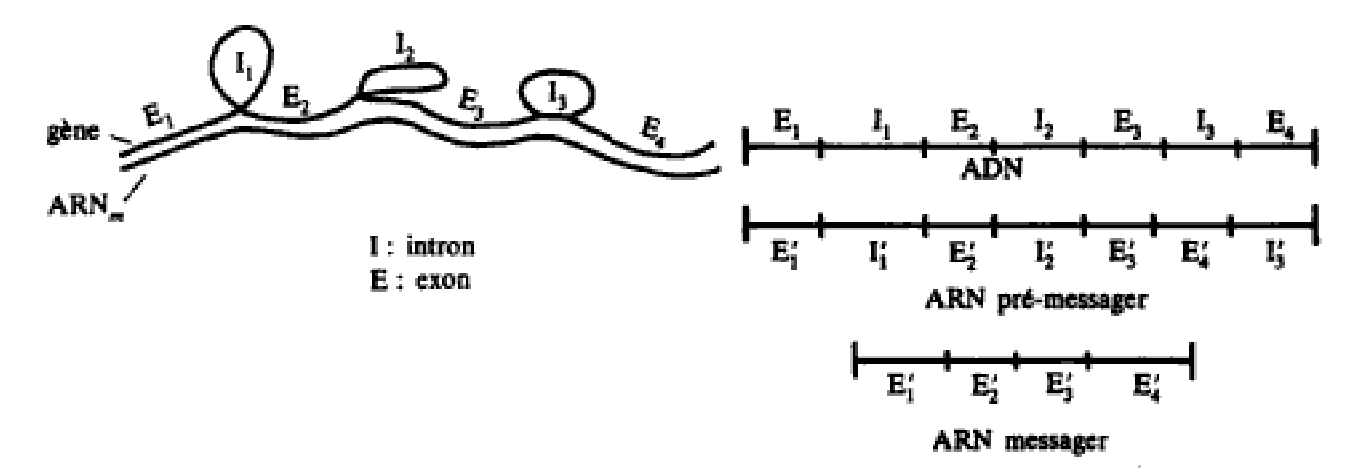


Figure 6.8a Hybridation entre un ADN d'eucaryote et un ARNm.

Figure 6.8b Synthèse de l'ARNm chez un eucaryote.

III. LES ACIDES RIBONUCLÉIQUES

A. Structure des acides ribonucléiques ou ARN

— Ce groupe est beaucoup plus hétérogène que le précédent. Comme les ADN, les ARN sont des polynucléotides résultant de la condensation de mononucléotides par des liaisons phosphodiester 3'-5' mais il s'agit là de *ribonucléotides-5'-monophosphates* et les bases azotées sont plus nombreuses. Parmi elles, quatre sont abondantes, ce sont : l'*adénine*, la *guanine*, la *cytosine* et l'*uracile* qui remplace ici la thymine. D'autres sont présentes en proportions plus faibles mais non négligeables, ce sont : la *méthyl-* et la *diméthyl-guanine*, le *pseudo-uracile*, l'*hypoxanthine*. Le nombre de monomères est donc plus grand.

(*) La notion d'ARN messager sera explicitée ultérieurement.

Les masses moléculaires sont plus variées et souvent plus faibles que pour les ADN. Elles sont comprises entre 25.000 et plusieurs millions de daltons.

La répartition des bases est différente de ce qu'elle est dans les ADN. Si dans de nombreux cas étudiés $G/C = 1$, il n'en est pas de même du rapport A/U équivalent au rapport A/T des ADN. On ne peut donc pas admettre une complémentarité des bases aussi complète que pour les ADN et par suite l'existence d'une structure aussi régulière, d'autant plus que les molécules d'ARN sont constituées par une seule chaîne polynucléotidique, ils sont *monocaténaires*. Le problème de leur structure est donc posé.

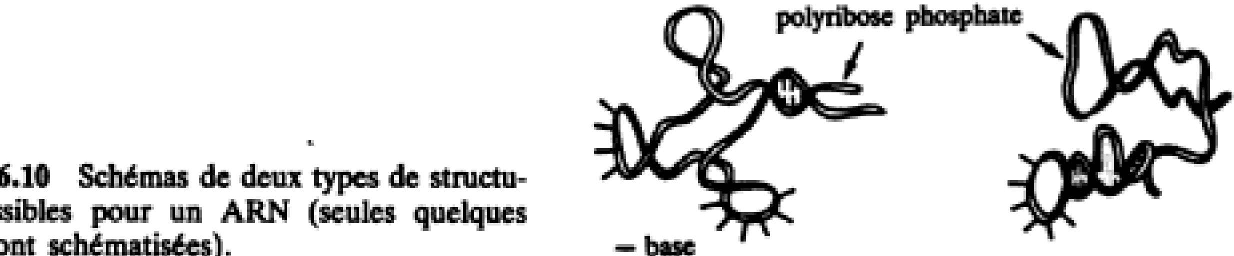


Figure 6.10 Schémas de deux types de structures possibles pour un ARN (seules quelques bases sont schématisées).

Au préalable il faut noter que l'on ne tient pas compte des bases rares et que la règle de complémentarité valable pour les ADN n'est peut-être pas applicable sans amendements aux ARN. Les diverses méthodes analytiques montrent que les ARN en solution possèdent sur une ou plusieurs parties de leur longueur des zones ayant une structure de double hélice stabilisée par des liaisons hydrogène (fig. 6.10). Ces zones hélicoïdales plus ou moins régulières peuvent sans doute occuper des positions variées le long de la chaîne, elles masquent les bases qui y participent en exposant au contraire les bases des zones non spiralisées.

Des ARN à configuration spatiale pseudo-hélicoïdale se rencontrent chez certains virus et transitoirement chez d'autres, lors de leur multiplication dans les cellules infectées.

B. Propriétés des acides ribonucléiques

Les propriétés physiques, en particulier de solubilité et d'absorption ultraviolette, sont analogues à celles des ADN.

La dénaturation thermique se manifeste également avec certains ARN mais le phénomène est plus progressif témoignant de l'existence de plusieurs zones en double hélice « fondant » successivement.

C. Répartition et état des acides ribonucléiques

1. LES ARN VIRAUX

De nombreux virus animaux (virus poliomyélitique, virus grippaux, etc.) et végétaux (virus de la mosaïque du tabac, de la mosaïque du navet, etc.) ainsi que

quelques bactériophages renferment un ARN de masse moléculaire élevée supérieure à 2 . 10^6 daltons.

Les bactériophages et les virus ne renferment qu'un seul type d'acide nucléique, ADN ou ARN.

2. LES ARN DES CELLULES PROCARYOTES ET EUCARYOTES

Les ARN sont répartis à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau, quand celui-ci existe. Ils peuvent être divisés en trois grandes classes.

• **Les ARN ribosomiques.** Ils représentent 80 % de l'ARN cellulaire total. Riches en guanine et cytosine, leur structure est monocaténaire avec de place en place des zones hélicoïdales.

Les ***ribosomes*** ou grains de ***Palade*** sont des particules de ribonucléoprotéines constituées par deux sous-unités accolées (constantes de sédimentation 50 S et 30 S).

Chaque sous-unité renferme un type particulier d'ARN noté dans ce cas r-ARN :

— r-ARN 23 S - masse moléculaire 1,2 . 10^6 daltons environ,
— r-ARN 16 S - masse moléculaire 5 . 10^5 daltons environ,
— r-ARN 5 S - masse moléculaire 3 . 10^4 environ.

Ce dernier, dont les structures primaire et secondaire sont connues, comprend 120 nucléotides. Nos connaissances sur les autres r-ARN sont très incomplètes. Tous dérivent cependant d'un ARN 45 S formé au niveau du nucléole.

• **Les ARN messagers** ou m-ARN. Leur existence, prédite par ***F. Jacob*** et ***J. Monod*** à partir de considérations théoriques, a été prouvée par des méthodes isotopiques. Ils représentent environ 5 % de l'ARN total. Leur masse moléculaire est élevée mais variable selon leur origine cellulaire ; leur renouvellement métabolique est rapide surtout chez les micro-organismes, enfin la séquence de leurs bases est complémentaire de celle d'un fragment d'ADN (fig. 6.8).

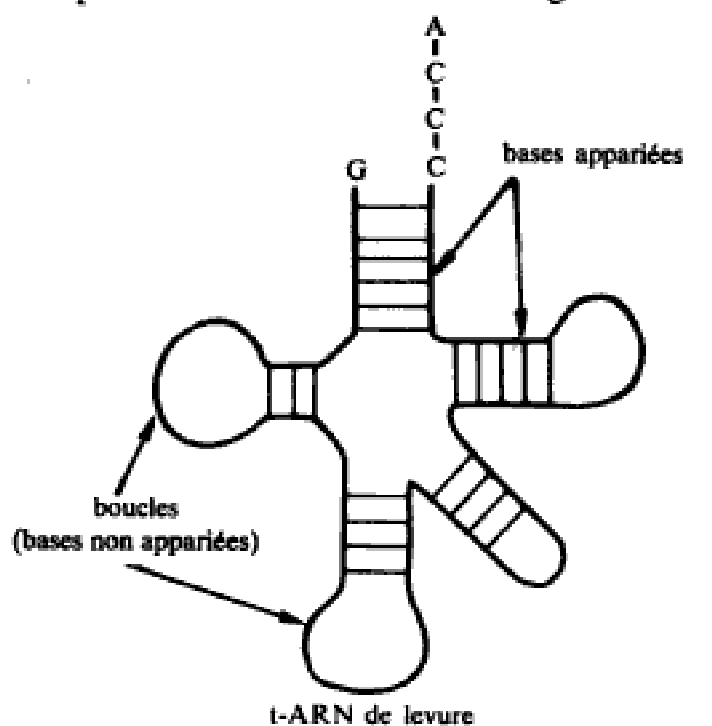


Figure 6.11 t-ARN accepteur de sérine. Structure schématique plane.

• **Les ARN de transfert** ou t-ARN. Encore appelés ARN solubles ou s-ARN par suite de leur solubilité dans les solutions concentrées de NaCl ont une masse moléculaire de l'ordre de $25 . 10^3$ daltons (soit 4 S) et correspondent à 5 ou 10 % de l'ARN cellulaire. Leur chaîne comporte environ 80 nucléotides, la séquence nucléotidique étant connue pour quelques-uns d'entre eux.

La plupart ont une extrémité de leur chaîne terminée par un triplet caractéristique correspondant aux bases C—C—A (voir tableau p. 195), l'autre extrémité portant la base G. Ils renferment une quantité assez importante de nucléotides rares.

Leur configuration spatiale est en feuille de trèfle repliée qui correspond à une structure compacte (fig. 6.11).

IV. LES DÉRIVÉS DE NUCLÉOTIDES

En dehors des acides nucléiques, les nucléotides entrent également dans la structure de nombreux composés dont les rôles sont essentiels en biochimie. Par exemple :

— des nucléosides-3'-5' monophosphates cycliques comme l'adénosine 3'-5' monophosphate cyclique ou AMP cyclique ;

NH_2 N N N N O O—H_2C 5' H H H H O=P O OH O^-

— des nucléosides 5'-polyphosphates : l'adénosine-5'-diphosphate ou ADP et l'adénosine 5' triphosphate ou ATP par exemple ;

NH_2 N N N N Adénine Ribose O CH_2—O—P—O—P—O—P—O^- O O O O^- O^- O^- OH OH AMP ADP ATP

— des dérivés plus ou moins complexes ayant un rôle de coenzyme comme le nicotinamide-adénine-dinucléotide ou NAD^+ ou le flavine-adénine-dinucléotide FAD.

Nicotinamide — $CONH_2$ — Ribose — $CH_2-O-P-O-P-O-CH_2$ — Pyrophosphate — Ribose — NH_2 — Adénine

Nicotinamide-Ribose-5'-phosphate

Adénosine-5'-monophosphate (AMP)

Structure du NAD^+

V. MÉTHODES D'ÉTUDE DES ACIDES NUCLÉIQUES

1. PRÉPARATION D'ACIDES NUCLÉIQUES

La *préparation* des acides nucléiques à partir d'un matériel riche (virus, bactéries, levures, thymus) est effectuée après broyage et parfois délipidation. L'extraction est généralement réalisée par une solution saline, les protéines sont dénaturées puis éliminées par centrifugation, enfin les acides nucléiques sont précipités par l'éthanol ou par acidification.

2. DOSAGE

Le *dosage* des acides nucléiques est réalisable soit par dosage colorimétrique du phosphore, soit par dosage colorimétrique des pentose, ribose ou désoxyribose.

3. LOCALISATION CELLULAIRE

Leur *localisation dans les cellules* a pu être établie par les méthodes spectrophotométriques et par les méthodes cytochimiques.

Ex. : Technique de Feulgen qui colore les ADN en rose. Une hydrolyse acide partielle libère les bases puriques et démasque des résidus désoxyribose qui peuvent alors réagir avec le réactif de Schiff.

Test de Brachet. Coloration par un mélange de vert de méthyle, qui colore l'ADN, et de pyronine qui colore l'ARN en rouge. L'hydrolyse enzymatique spécifique de l'ARN complète cette technique.

4. SÉPARATION ÉLECTROPHORÉTIQUE DES ADN

En milieu tamponné, les ADN chargés négativement migrent dans un champ électrique, vers l'anode ; leur déplacement est fonction de leur mobilité apparente, grandeur qui dépend essentiellement de leur charge et de leur taille. Une électrophorèse sur support classique ne permet pas de séparer les ADN avec une résolution suffisante ; en effet, le rapport de la charge à la taille est pratiquement le même pour tous les acides nucléiques, et leurs mobilités électrophorétiques sont, par conséquent, très proches les unes des autres.

En revanche, si l'électrophorèse se pratique au sein d'un gel de polyacrylamide ou d'agarose, l'effet de tamis moléculaire dû à la structure réticulée du gel permet la séparation des acides nucléiques en fonction de leur taille : le gel d'agarose à mailles larges convient aux grosses molécules, le gel de polyacrylamide est plus ou moins fortement réticulé, selon son taux de pontage ; très serré, il possède un pouvoir de résolution permettant la séparation de fragments d'ADN allant jusqu'au stade du nucléotide.

La révélation des spots est faite au bleu d'éthidium qui donne une fluorescence orange. Quelquefois, on est amené à séparer des fragments d'ADN radioactif, la révélation est faite, alors, par autoradiographie.

5. AUTORADIOGRAPHIE

Cette technique, mise au point et développée par J. Cairns, a, dans un premier temps, permis de décrire le chromosome circulaire bactérien et son mode de réplication.

L'ADN est marqué par un isotope radioactif, par exemple en fournissant de la thymidine tritiée comme précurseur au cours de la synthèse d'ADN par une bactérie.

L'ADN, ainsi rendu radioactif, est extrait de la bactérie, déployé et déposé sur une émulsion photographique ; sous l'effet du rayonnement émis par le tritium, l'émulsion photographique est impressionnée. Après développement et agrandissement, les traces dues aux effets de la radioactivité apparaissent en noir.

Depuis, cette technique a été utilisée à d'autres fins, en particulier comme méthode de révélation d'électrophorèse d'ADN ; il suffit d'insérer, à une extrémité hydroxylée un phosphate dans lequel le phosphore est l'isotope ^{32}P.

6. DÉTERMINATION DE LA SÉQUENCE D'UN ADN

La détermination de la séquence d'un ADN est une technique mise au point récemment et qui va de pair avec les progrès accomplis en génie génétique.

Il existe deux méthodes : dans l'une, on procède par coupure chimique, l'autre est fondée sur la réplication enzymatique.

a. La méthode de Maxam et Gilbert

La méthode de Maxam et Gilbert est fondée sur les trois principes suivants :

— Le brin d'ADN à séquencer est marqué à l'extrémité 5′ par du phosphate ^{32}P.

— Il est coupé chimiquement de façon sélective au niveau de certains nucléotides.

— Les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, la révélation est faite par autoradiographie.

La **fixation du marqueur** (phosphate ^{32}P) à l'extrémité 5′ du morceau d'ADN à analyser est réalisée en phosphorylant l'hydroxyde libre 5′ par une polynucléotide kinase.

La **coupure chimique spécifique** est réalisée de quatre façons différentes :

— une coupure spécifique en *G*

— une coupure spécifique en *C*

— une coupure en *G* + *A*

— une coupure en *C* + *T*.

Ces coupures sont pratiquées en détruisant sélectivement un nucléotide, dans des conditions expérimentales volontairement contrôlées, de façon à n'avoir qu'un petit nombre de coupures par fragment d'ADN à séquencer. On opère sur 4 échantillons équivalents.

Les réactions chimiques sont décrites ci-dessous :

Réaction G :
L'azote N_7 de la guanine est méthylé par la diméthylsulfate.

Réaction C :

En présence de NaCl, l'hydrazine attaque les carbones C_4 et C_6 de la cytosine. La base ainsi modifiée est éliminée. La pipéridine attaque le *D*-ribose et coupe les liaisons phosphodiesters.

NH_2—NH_2

OH⁻

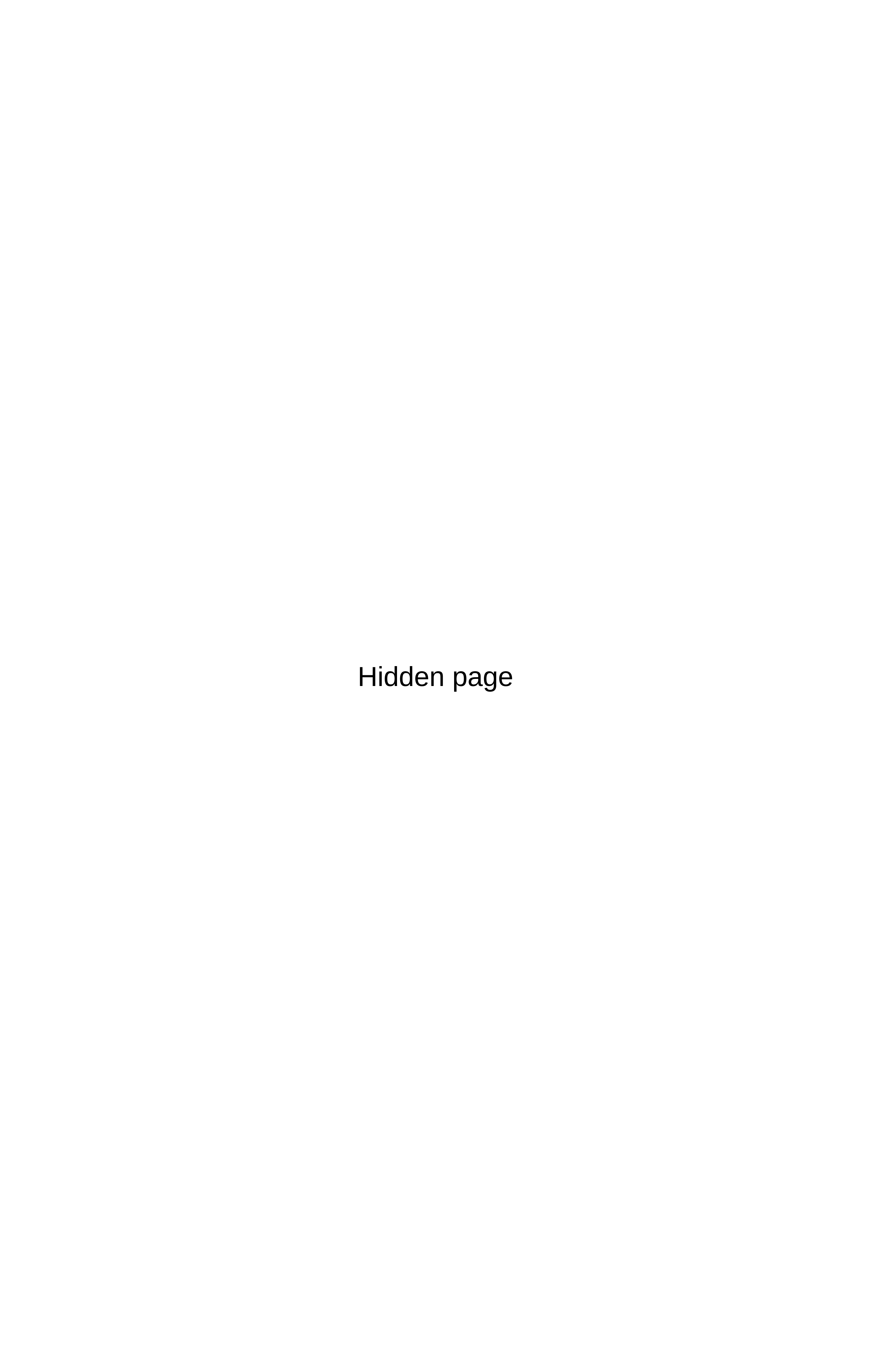
Réaction C + T :
En l'absence de NaCl, les deux pyrimidines sont attaquées par l'hydrazine.

Les oligonucléotides obtenus par les quatre coupures sur les quatre échantillons identiques sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les produits des réactions sont soumis à une migration en parallèle. Le marqueur radioactif révèle par autoradiographie les fragments 5′ terminaux. Les fragments les plus courts sont les plus mobiles.

Soit, à titre d'exemple, à séquencer le fragment suivant marqué au ^{32}P en 5′.

5′●—TCCGATCGAACC
^{32}P

Réaction chimique	G		A + G					C					C + T					
Oligonucléotides radioactifs obtenus	TCC	TCCGATC	TCC	TCCG	TCCGATC	TCCGATCG	TCCGATCGA	T	TC	TCCGAT	TCCGATCGAA	TCCGATCGAAC	T	TC	TCCGA	TCCGAT	TCCGATCGAA	TCCGATCGAAC
^{32}P ⟶	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	••	•	•	•	•	•
Taille des oligonucléotides	3	7	3	4	7	8	9	1	2	6	10	11	1	2	5	6	10	11


Hidden page

Soit, à titre d'exemple, à séquencer le fragment suivant :

5' GCTTAGCCACCGA 3'

Incubation avec les mélanges	ddCTP / dCTP*			ddGTP / dGTP*					ddATP / dATP*		ddTTP / dTTP*		
Oligonucléotides obtenus			dC										
			G					dG					
			A					A		dA			
			A					A	dA	A			
			T					T	T	T			dT
		dC	C					C	C	C			C
		G	G				dG	G	G	G			G
		G	G			dG	G	G	G	G			G
		T	T			T	T	T	T	T		dT	T
		G	G		dG	G	G	G	G	G		G	G
		G	G	dG	G	G	G	G	G	G		G	G
	dC	C	C	C	C	C	C	C	C	C		C	C
	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	dT	T	T
Amorce →	⊓	⊓	⊓	⊓	⊓	⊓	⊓	⊓	⊓	⊓	⊓	⊓	⊓
Taille des oligonucléotides	2	8	13	3	4	6	7	12	10	11	1	5	9

7. DÉTERMINATION DE LA SÉQUENCE DES ARN

a. Méthode à la transcriptase réverse

La transcriptase réverse est une enzyme qui copie un ARN en un brin d'ADN complémentaire.

Il suffira de déterminer la séquence du brin d'ADNc.

b. Méthodes de coupures enzymatiques

L'ARN est marqué en 5' à l'aide d'une polynucléotide kinase et d'ATP marqué au ^{32}P.

L'ARN à séquencer est coupé spécifiquement à l'aide d'enzymes :

les ribonucléases (ou RNAses) qui sont des endonucléases et les phosphodiestérases qui sont des exonucléases.

Les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse sur gel.

c. Méthodes des coupures chimiques

La méthode est la même que celle qui a été décrite pour l'ADN, la chaîne est coupée spécifiquement par modification chimique d'une base.

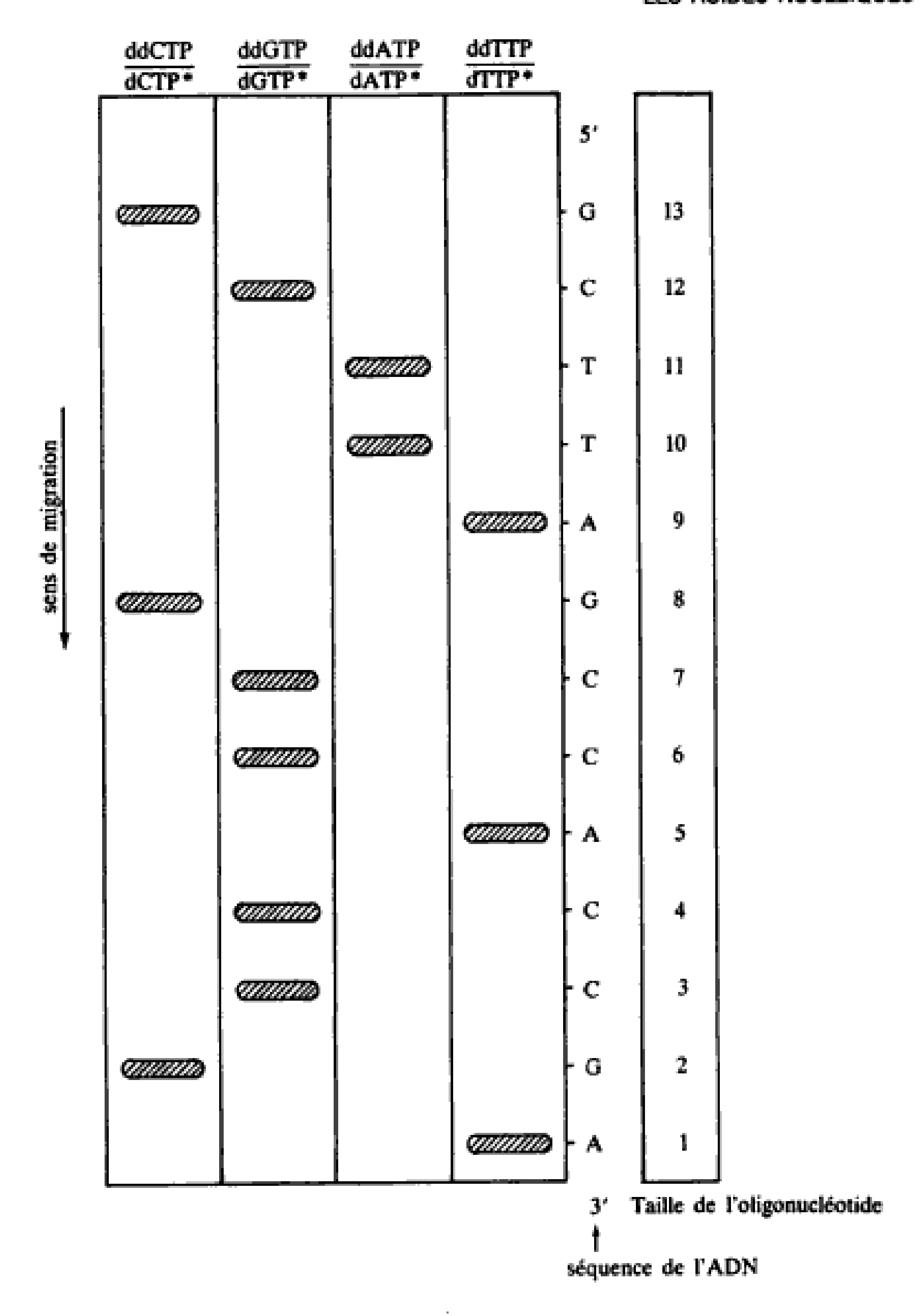


Figure 6.13 Profil du gel d'électrophorèse des oligonucléotides.

ENDONUCLÉASE	COUPURE
RNAse T_1	Hydrolyse d'une chaîne d'ARN du côté 3' d'un résidu guanine O O═P—O⁻ O H_2C O GUANINE O O═P—O⁻ O coupure par la RNAse T_1 CH_2
RNAse PANCRÉATIQUE	Hydrolyse d'une chaîne d'ARN du côté 3' d'un résidu pyrimidique O O═P—O⁻ O H_2C O URACILE ou CYTOSINE O O═P—O⁻ O coupure par la RNAse pancréatique CH_2
RNAse U_2	Hydrolyse d'une chaîne d'ARN du côté 3' d'un résidu purique O O═P—O⁻ O H_2C O GUANINE ou ADÉNINE O O═P—O⁻ O coupure par la RNAse U_2 CH_2
EXONUCLÉASE	**COUPURE**
Phosphodiestérase de rate de bœuf	Hydrolyse d'une chaîne d'ARN à partir de l'extrémité 5' — à condition qu'elle ne soit pas phosphorylée et libération d'un mononucléotide 3' monophosphate
Phosphodiestérate de venin de serpent	Hydrolyse d'une chaîne d'ARN à partir de l'extrémité 3' — à condition qu'elle ne soit pas phosphorylée et libération d'un mononucléotide 5' monophosphate

Figure 6.14 Enzymes hydrolysant spécifiquement l'ARN.

7
Les lipides

Cet autre groupe de constituants essentiels de la matière vivante, qui représente 10 à 15 % du poids sec est très hétérogène. Les seuls caractères véritablement communs sont physiques : toucher onctueux, formation sur le papier de taches ne disparaissant pas à la chaleur et surtout solubilités. Les lipides sont insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques (éthanol chaud, acétone, éther de pétrole, benzène, éther, etc.), en particulier dans les solvants apolaires, ce qui est une conséquence de leur structure chimique.

L'analyse immédiate montre que les lipides naturels (matières grasses et lipides de constitution) sont des mélanges, souvent complexes et difficiles à fractionner quantitativement par suite du nombre élevé et de la parenté chimique des espèces moléculaires qu'ils renferment. Avant l'introduction des techniques analytiques modernes, techniques chromatographiques notamment, la composition des lipides naturels ne pouvait être appréciée, de manière rapide et simple, qu'à l'aide de données arbitraires : les indices, que nous définirons lors de l'étude des propriétés chimiques.

Les produits résultant du traitement d'un lipide naturel par la soude, ou la potasse, à l'ébullition, peuvent être séparés en deux fractions.

Une *fraction extractible par l'éther*, formée de substances n'ayant pas subi de modifications au cours du traitement (1), et qualifiée *d'insaponifiable*. Ces substances liposolubles comprennent des stérols, des carbures d'hydrogène, des vitamines, etc. Elles constituent l'ensemble des substances lipoïdiques ou lipoïdes.

Une *fraction hydrosoluble* formée de composés variés parmi lesquels figurent de façon permanente au moins un alcool et les sels d'acides organiques aliphatiques à nombre élevé d'atomes de carbone : les sels d'*acides gras*. Ces substances, formées lors de la saponification, étaient primitivement combinées dans le lipide.

Ce caractère chimique, le plus général, démontre que les lipides contiennent, pour la plupart, au moins une molécule d'acide gras, combinée sous forme d'ester, quelquefois sous forme d'amide.

A l'ancienne classification en lipides simples et complexes, on substitue maintenant une classification plus chimique :

— Les acides gras.

— Les glycérolipides ou esters du glycérol qui sont subdivisés en glycérides (ou acyl-glycérols) et en glycérophospholipides.

— Les sphingolipides ou amides de la sphingosine.

(1) Les altérations possibles ne sont pas prises en considération ici.

— Les cérides, esters d'alcools supérieurs à nombre élevé d'atomes de carbone.

— Les stérides, esters d'alcools polycycliques complexes, les stérols.

— Les lipides isopréniques qui comportent : les carbures isopréniques (carotènes et caroténoïdes), les stérols et stéroïdes, les quinones et hétérocycles oxygénés à chaînes isopréniques (vitamine E, vitamine K et ubiquinone).

Structure et propriétés des principaux lipides

I. LES ACIDES GRAS NATURELS

Les acides gras naturels les plus répandus présentent un certain nombre de caractères communs. Ce sont des *mono-acides aliphatiques, non ramifiés et à nombre pair d'atomes de carbone*. Si toute la série allant de 2 à 38 atomes de carbone est représentée chez les êtres vivants, les termes à 16 et 18 atomes de carbone sont de loin les plus abondants.

A. Exemples d'acides gras naturels

D'après la structure chimique, on peut distinguer :

— *Les acides gras saturés* : $C_nH_{2n}O_2$,

$n = 4$	acide *n*-butanoïque ou *acide butyrique*	$C_4H_8O_2$	C_3H_7—COOH
$n = 6$	acide *n*-hexanoïque ou *acide caproïque*	$C_6H_{12}O_2$	C_5H_{11}—COOH
$n = 14$	acide *n*-tétradécanoïque ou *acide myristique*	$C_{14}H_{28}O_2$	$C_{13}H_{27}$—COOH
$n = 16$	acide *n*-hexadécanoïque ou *acide palmitique*	$C_{16}H_{32}O_2$	$C_{15}H_{31}$—COOH
$n = 18$	acide *n*-octadécanoïque ou *acide stéarique*	$C_{18}H_{36}O_2$	$C_{17}H_{35}$—COOH
$n = 20$	acide *n*-eicosanoïque ou *acide arachidique*	$C_{20}H_{40}O_2$	$C_{19}H_{39}$—COOH
$n = 24$	acide *n*-tétracosanoïque ou *acide lignocérique*	$C_{24}H_{48}O_2$	$C_{23}H_{47}$—COOH
$n = 30$	acide *n*-triacontanoïque ou *acide mélissique*	$C_{30}H_{60}O_2$	$C_{29}H_{59}$—COOH

Chaque acide gras est constitué par une chaîne hydrocarbonée, plus ou moins longue, fortement apolaire et un groupement carboxyle polaire.

Ex. : Acide palmitique $C_{15}H_{31}$—COOH

Exemples :

• **Acides alcools.** — L'*acide ricinoléique,* dérivé de l'acide oléique :

$$CH_3-(CH_2)_5-CHOH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$$

L'*acide cérébronique* en C_{24} est un acide α-alcool.

La présence de l'hydroxyle introduit un carbone asymétrique dans la molécule et par suite l'existence d'une activité optique pour l'acide gras et les lipides qui le renferment.

• **Acides gras insaturés** possédant une *triple liaison,* ce qui est exceptionnel dans les composés biochimiques.

• **Acides gras cycliques** comme les *acides hydnocarpique* en C_{16} et *chaulmoogrique* en C_{18} dont les glycérides sont utilisés dans le traitement de la lèpre. De même, l'*acide lactobacillique,* isolé de bacilles lactiques et facteur de croissance pour certains bacilles, possède une structure partiellement cyclisée.

• **Acides gras ramifiés** et à **nombre impair d'atomes de carbone.** Longtemps considérés comme exceptionnels, il est maintenant plus correct de dire qu'ils sont le plus souvent très peu abondants.

Les lipides bactériens et plus spécialement les cires des Mycobactéries, dont le bacille de Koch, contiennent des acides gras ramifiés responsables de leurs propriétés chimiques et physiologiques particulières.

L'*acide tuberculostéarique* en C_{19}, les *acides phtiénoïques* et les *acides mycocérosiques* ont des ramifications constituées par des groupements méthyle.

Les *acides mycoliques* entrent dans la composition du « *Cord factor* » (lipide toxique sécrété par les bacilles de Koch virulents). Leurs masses molaires sont élevées et leurs structures ramifiées complexes.

B. Propriétés physiques des acides gras

— *Etat.* — Le point de fusion, donc l'*état physique,* dépend :

• d'une part du *nombre d'atomes de carbone* pour une série homologue. ***Ex.*** : Les acides gras saturés ayant moins de 10 atomes de carbone sont des liquides, volatils pour les premiers termes, huileux pour les derniers. Ils sont entraînables par la vapeur d'eau. Les acides gras renfermant 10 atomes de carbone ou plus sont solides et le point de fusion s'élève régulièrement dans la série ;

• d'autre part du *taux d'insaturation.* Dans la série des acides gras à 18 atomes de carbone, l'acide stéarique est solide $\left(T_f = +69\ °C\right)$ alors que les acides oléique, linoléique, linolénique sont liquides (T_f respectifs + 16 °C, – 5 °C, – 11 °C).

— *Solubilités.* — Les solubilités des acides gras sont liées à la structure de type bipolaire de leurs molécules. Très rapidement l'hydrophobie de leur chaîne hydrocarbonée apolaire l'emporte sur la faible hydrophilie de leur carboxyle peu dissocié. Seuls les premiers termes sont solubles dans l'eau et très faiblement ionisés, les homologues supérieurs étant insolubles.

Les acides gras les plus répandus sont solubles dans la plupart des solvants organiques.

Comme toutes les molécules possédant cette structure bipolaire, les acides gras ont tendance, en fonction de la présence d'eau, à s'associer en ensembles orientés. Ainsi, selon l'état de l'acide gras et la nature des phases constituant l'interface, les molécules s'orientent en fonction des polarités pour constituer des structures feuilletées (films) ou micellaires (fig. 7.1).

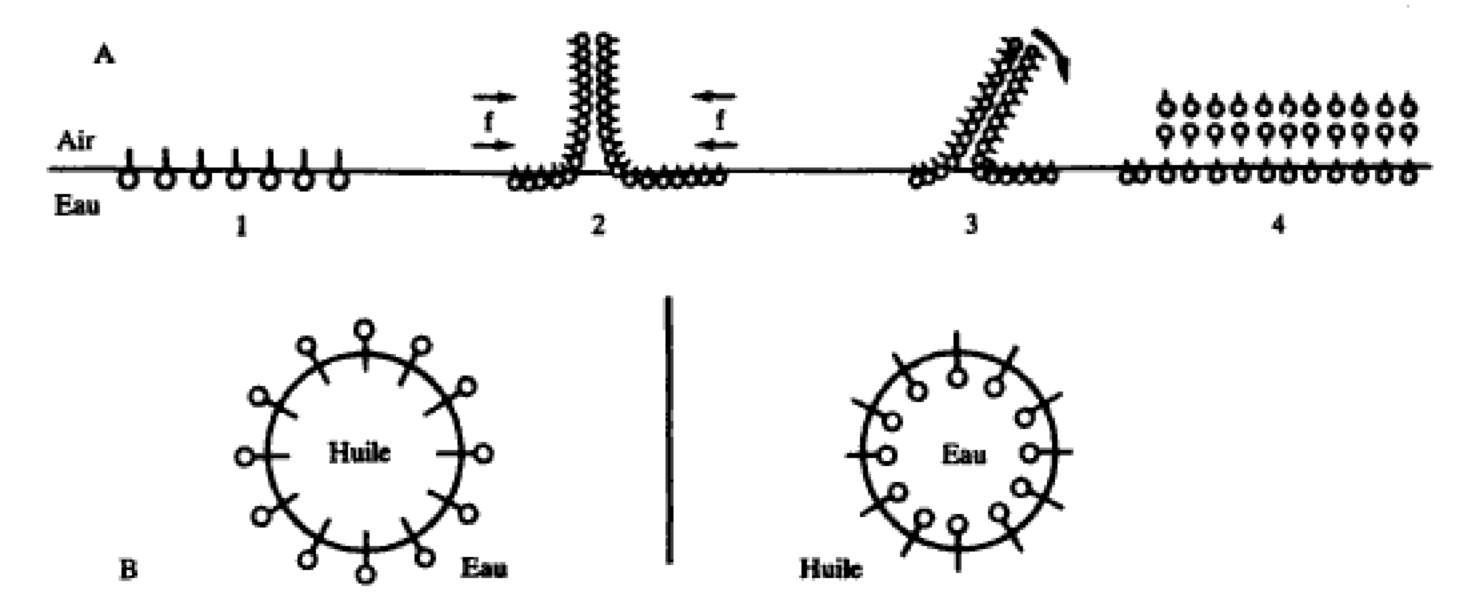


Figure 7.1 Associations des molécules d'acides gras.
A. Structures feuilletées : 1. couche monomoléculaire, 2 et 3. formes de passage, 4. couches empilées.
B. Structures micellaires.

L'étude physique des films monomoléculaires a permis de préciser la forme et les dimensions moléculaires ainsi que des valeurs approchées des forces de cohésion intermoléculaires et les déformations possibles. Autant de données utiles pour l'étude de la structure des membranes cellulaires.

C. Propriétés chimiques des acides gras

Par leur carboxyle, les acides gras forment des combinaisons caractéristiques de cette fonction (esters, anhydrides, amides, acylmercaptans). Ces composés sont importants pour le métabolisme mais dans cette étude chimique nous ne retiendrons que la formation de sels.

Les chaînes aliphatiques sont peu réactives, seule la présence de doubles liaisons leur confère des propriétés intéressantes.

— *Salification des acides gras : les savons.* — Traités par les bases, les acides gras forment des sels appelés savons.

$$C_{17}H_{33}\text{—COOH} + NaOH \rightarrow C_{17}H_{33}\text{—COONa} + H_2O$$

Acide oléique *Oléate de sodium*

Dans le vocabulaire courant, le terme de savon désigne un mélange de sels alcalins d'acides gras à nombre élevé d'atomes de carbone. Les savons durs sont sodiques, les savons mous potassiques. Industriellement, ces savons sont préparés directement à partir des matières grasses par saponification des glycérides.

— Les savons alcalins sont solubles dans l'eau, leur forte dissociation augmentant l'hydrophilie. Les anions gras $R{-}COO^-$ en solution abaissent la tension superficielle aux interfaces : les savons sont tensioactifs. De là résultent leurs propriétés mouillantes, moussantes et émulsionnantes, c'est-à-dire leur pouvoir détersif. Actuellement, on remplace souvent les savons par des agents tensioactifs synthétiques dont la structure est analogue (alkylsulfonates $R{-}SO_3Na$, sels d'ammonium quaternaire, etc.).

Ces anions gras peuvent également être précipités dans diverses conditions.

• Par addition d'un cation non alcalin $(Ca^{2+}, Mg^{2+}, Ba^{2+}, Pb^{2+})$ il se forme un savon insoluble. Si l'on ajoute, à une eau naturelle calcique, une solution alcoolique de savon alcalin, il apparaît un précipité floconneux de savon de calcium :

$$2\,R{-}COO^-\,Na^+ + Ca^{2+} \rightarrow (R{-}COO)_2Ca + 2\,Na^+$$

Ce n'est qu'en présence d'excès de savon alcalin que les propriétés détersives se manifesteront. Ce principe a été utilisé pour déterminer la dureté (minéralisation calcique et magnésienne) des eaux naturelles selon la méthode hydrotimétrique.

De même, en présence d'une protéine chargée positivement, il y a précipitation de la combinaison acide gras-protéine.

• Par acidification ou par addition d'une solution concentrée de chlorure de sodium, les dissociations se trouvent diminuées d'où l'insolubilisation.

$$R{-}COO^-Na^+ + \underset{\text{Excès}}{H^+} \rightleftarrows \underline{R{-}COOH} \downarrow + Na^+$$

$$R{-}COO^- + \underset{\text{Excès}}{Na^+} \rightleftarrows \underline{R{-}COONa} \downarrow$$

Cette dernière réaction utilisée lors de la préparation des savons a reçu le nom de relargage.

Les acides gras peuvent être dosés, dans un solvant convenable, à l'aide d'une solution de potasse alcoolique en présence de phénolphtaléine. Ce dosage appliqué à un corps gras permet d'évaluer la quantité globale d'acides gras libres. Le résultat, appelé *indice d'acide,* correspond au nombre de milligrammes de potasse nécessaire pour neutraliser l'acidité libre contenue dans 1 g de matière grasse. Il dépend à la fois de la quantité et de la masse molaire des acides présents.

— *Propriétés des acides gras insaturés.* — Il s'agit essentiellement de réactions d'addition qui, bien que propres aux acides gras, seront étudiées avec les glycérides ; car ce sont à eux qu'elles sont le plus généralement appliquées.

D. Les prostaglandines

Les prostaglandines sont des acides gras, existant à l'état libre dans de nombreux tissus, où ils jouent un rôle de modulateur hormonal.

Leur nom vient du fait qu'elles ont été isolées pour la première fois du tissu prostatique.

Ce sont des acides gras à vingt atomes de carbone, comportant un cycle à cinq carbones, insaturé et oxygéné (substitué par des groupements céto ou hydroxy).

Les prostaglandines forment un ensemble de seize molécules, actuellement identifiées, une modification de structure, même minime, modifie de façon importante leur activité.

Ces molécules sont synthétisées à partir de l'acide arachidonique.

15 14 12 11 9 8 6 5 1 COOH

CH_3

acide arachidonique

Leur concentration intracellulaire faible résulte de leur rôle de médiateur hormonal, les molécules sont continuellement synthétisées puis rapidement détruites après avoir été élaborées.

Une grande variété d'activités biologiques a été attribuée aux prostaglandines :
— stimulation de la musculature lisse,
— accroissement des inflammations,
— certaines provoquent l'avortement ou l'accouchement,
— modulation de l'irrigation sanguine de certains organes,
— contrôle du passage des ions à travers les membranes cellulaires,
— contrôle de la transmission synaptique.

Bien que leur mode d'action ne soit pas élucidé, on pense que les prostaglandines servent de médiateurs locaux de certaines hormones ; dans certaines cellules elles agissent sur le taux d'AMP cyclique.

La PGE_1 est un inhibiteur des hormones stimulant la lipolyse, ces dernières agissent en stimulant l'adénylcyclase des adipocytes. La PGE_1 s'oppose à la synthèse d'AMPc.

O COOH CH_3 OH OH

PGE_1

L'aspirine exerce son effet anti-inflammatoire et analgésique en inhibant la synthèse des prostaglandines qui activent l'inflammation et s'opposent à la synthèse des endorphines.

II. LES GLYCÉROLIPIDES

Les glycérolipides simples (acylglycérols) représentent une réserve d'énergie utilisable, les triglycérides représentent 90 % des lipides de l'adipocyte.

Les glycérolipides complexes (phosphoglycérolipides) sont essentiellement des lipides structuraux :

— ils participent à la structure des membranes plasmiques,
— ils sont des constituants du vitellus des œufs,
— avec les spingolipides, ils sont abondants dans le tissu nerveux.

A. Le glycérol

C'est le plus simple des triols $CH_2OH—CHOH—CH_2OH$ qui se présente comme un liquide incolore, sirupeux, à saveur sucrée, plus dense que l'eau mais miscible à elle en toutes proportions.

Chauffé en présence d'hydrogénosulfate de potassium, le glycérol subit une déshydratation en *acroléine* : $CH_2{=}CH—CHO$, aldéhyde éthénique à odeur caractéristique, irritant les voies respiratoire et toxique.

L'estérification du glycérol peut conduire à une grande variété d'esters différents les uns des autres, soit par le nombre et la position des hydroxyles estérifiés, soit par la nature des acides ainsi combinés.

Ex. : Esters organiques du glycérol :

α-CH_2OH | β-CHOH | α-CH_2OH	CH_2—O—CO—*R* | CHOH | CH_2OH	CH_2OH | CH—O—CO—*R* | CH_2OH
Glycérol	α-monoglycéride	β-monoglycéride
CH_2—O—CO—*R* | CHOH | CH_2—O—CO—*R*	CH_2—O—CO—*R* | CH—O—CO—*R* | CH_2OH	CH_2—O—CO—*R* | CH—O—CO—*R'* | CH_2—O—CO—*R*
αα'-diglycéride homogène	αβ-diglycéride homogène	Triglycéride hétérogène ou mixte

La forme métaboliquement active du glycérol est le glycérol-phosphate encore appelé acide glycéro-phosphorique :

```
CH2OH
|
CHOH     O
|        ||
CH2—O—P—OH
         |
         OH
```

Le carbone 2 représente un centre de chiralité, l'isomère présent dans les phosphoglycérolipides est le *L* glycérol-3-phosphate.

Représentation de Fischer du glycérol-3-phosphate.

$$\begin{array}{c} CH_2OH \\ HO \blacktriangleleft C \blacktriangleright H \\ CH_2-O-P(=O)(OH)-OH \end{array}$$

B. Les glycérides (acylglycérols)

Les glycérides contenus dans les tissus adipeux animaux et dans les huiles ou les graisses végétales sont en majeure partie constitués par des triglycérides que l'on appelle généralement glycérides neutres. De plus, les matières grasses sont des mélanges de nombreux glycérides, les uns *simples* ou *homogènes,* les autres *mixtes* ou *hétérogènes* ; ces derniers étant, à de rares exceptions près, les plus abondants.

La nomenclature des glycérides est celle des esters.

Glycéride simple	Glycéride mixte
$CH_2-O-CO-C_{17}H_{33}$	$CH_2-O-CO-C_{17}H_{33}$
$CH-O-CO-C_{17}H_{33}$	$CH-O-CO-C_{17}H_{35}$
$CH_2-O-CO-C_{17}H_{33}$	$CH_2-O-CO-C_{17}H_{33}$
Trioléate de glycéryle	Oléate 1 stéarate 2 oléate 3 de glycéryle

1. PROPRIÉTÉS PHYSIQUES

— **Etat.** — Les glycérides sont des liquides ou des solides, onctueux au toucher car leur point de fusion est relativement bas et leur fusion pâteuse. Les points de fusion des triglycérides dépendent de la nature des acides gras constitutifs : les *huiles,* liquides à 15 °C, sont riches en acides gras insaturés ; les *beurres* $(T_f \sim 25\ °C)$ renferment des acides gras saturés à petit nombre d'atomes de carbone ; les *graisses* $(T_f \sim 35 \text{ à } 40\ °C)$ sont constituées de triglycérides riches en acides gras saturés et insaturés à 16 et 18 atomes de carbone ; enfin les *suifs* $(T_f > 40\ °C)$ contiennent beaucoup de tristéarate de glycéryle (tristéarine).

— **Solubilités.** — Les glycérides sont remarquablement insolubles dans l'eau, à froid comme à chaud, les groupements hydrophiles étant engagés dans les liaisons esters. Ils sont très peu solubles dans l'éthanol à froid, à l'exception de l'huile de ricin riche en acide ricinoléique, mais par contre solubles dans l'éthanol chaud et très solubles dans le benzène, l'éther, le chloroforme, le tétrachlorure de carbone, l'éther

— **Réactions d'addition.** — Elles concernent les glycérides renfermant dans leurs molécules des restes d'acides gras insaturés, ce qui est le cas pour les huiles.

• **Addition d'hydrogène.** — Par hydrogénation sous pression en présence de catalyseurs, on sature les doubles liaisons. A partir d'huiles, on prépare ainsi des graisses, les margarines, qui sont ensuite colorées et aromatisées.

• **Addition d'halogènes.** — La détermination de la quantité d'halogène fixé par addition traduit l'importance du caractère insaturé d'un glycéride. En principe 2 atomes d'halogène se fixent sur une double liaison :

$$\text{—CH=CH—} + X_2 \longrightarrow \text{—CH}X\text{—CH}X\text{—}$$

Le brome et surtout le chlore donnent lieu, en plus de l'addition, à des phénomènes de substitution. Aussi utilise-t-on le plus souvent l'iode ou l'un de ses dérivés plus actifs, monochlorure ou monobromure d'iode (ICl ou IBr) selon la méthode. La substance grasse est solubilisée dans un solvant inactif sur le réactif, le chloroforme ou le tétrachlorure de carbone, et le dosage est réalisé dans des conditions définies (concentrations des réactifs, temps de contact). L'indice d'iode, qui représente le nombre de grammes d'iode que peuvent fixer par addition 100 g de substance, est en général élevé pour les huiles, moyen pour les graisses et faible pour les beurres et surtout les suifs.

Ex. : Indices d'iode de l'huile de lin 180, de l'huile d'olive 90, de la graisse de porc 60, du beurre de vache 30.

Il n'y a pas toujours un parallélisme étroit entre l'indice d'iode et le point de fusion car pour ce dernier la longueur des chaînes carbonées intervient également.

• **Fixation d'oxygène.** — L'oxydation des acides gras insaturés par le permanganate en milieu alcalin ou par l'ozone provoque la scission de la molécule au niveau de la double liaison :

$$R\text{—CH=CH—}R'\text{—COOH} + 4\,\underline{\text{O}} \rightarrow \underset{\textit{Monoacide}}{R\text{—COOH}} + \underset{\textit{Diacide}}{\text{HOOC—}R'\text{—COOH}}$$

L'identification des acides formés permet de situer l'emplacement de la double liaison.

Les glycérides insaturés peuvent également s'oxyder lentement au contact de l'air (auto-oxydation), d'autant plus facilement que les doubles liaisons sont plus nombreuses, surtout si elles sont conjuguées. Cette oxydation est à l'origine de deux phénomènes : le *rancissement* et la *siccativité*.

Le rancissement est une fixation peu importante d'oxygène entraînant la formation de peroxydes (décelables par addition d'iodure de potassium) puis, par rupture de la chaîne carbonée, celle d'aldéhydes et d'acides. Sous l'influence de bactéries le phénomène peut être accompagné d'un début d'hydrolyse libérant les acides gras.

Le rancissement se traduit par une augmentation de l'indice d'acide et une odeur désagréable, rance. La matière grasse devient impropre pour la consommation d'autant plus que certains composés formés sont toxiques.

Ce phénomène d'oxydation des acides insaturés peut être d'origine enzymatique. Les *lipoxydases,* enzymes qui catalysent cette oxydation, sont inhibées par les

tocophérols (p. 256) ou vitamines E qui représentent des « anti-oxygènes » naturels retardant le rancissement.

La *siccativité* correspond à une fixation plus importante d'oxygène. Elle est accompagnée de la formation de substances volatiles et d'un changement de consistance de l'huile, qui se polymérise, durcit, formant un vernis. On obtient ainsi un enduit insoluble, imperméable, donc protecteur. La siccativité est accélérée par différents sels de manganèse et de plomb, appelés « siccatifs ».

Seuls les acides polyéthéniques subissent cette oxydation. D'après leur répartition, on distingue des huiles non siccatives (huile d'olive), des huiles semi-siccatives (huiles de coton, de moutarde) et des huiles siccatives (huiles de lin, de bois de Chine, riches en acides linolénique et éléostéarique). L'intérêt pratique de ces huiles a beaucoup diminué depuis la mise au point des peintures synthétiques.

C. Les glycérophosphatides ou phosphoglycérolipides

1. LES GLYCÉROPHOSPHATIDES SIMPLES

a. Les acides phosphatidiques

Ce sont les plus simples des lipides complexes et les plus proches des glycérides. Leur hydrolyse libère une molécule de glycérol, une molécule d'acide phosphorique et deux molécules d'acides gras.

$$\begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2—O—PO_3H_2 \end{array} \qquad \begin{array}{l} CH_2—O—CO—R \\ | \\ CH—O—CO—R' \\ | \\ CH_2—O—Ⓟ \end{array}$$

glycérol 3 phosphate — acide phosphatidique

Ces lipides, aux propriétés acides très marquées, sont présents sous forme de sels chez les végétaux (chou, épinard), chez certaines bactéries (bacille de Koch) et dans les tissus animaux (les cardiolipides du cœur de bœuf sont des acides polyphosphatidiques).

Ces molécules peuvent résulter de l'hydrolyse partielle de lipides plus complexes, mais elles représentent surtout les précurseurs de tous les glycérolipides : glycérides et phosphoglycérolipides.

b. Les inositides ou inositophosphatides

Les plus simples dérivent des acides phosphatidiques par estérification d'une deuxième fonction acide de l'acide phosphorique par un alcool cyclique, l'inositol $C_6H_{12}O_6$. ***Ex.*** : inositophosphatide de germe de blé :

Glycérol — acide palmitique
Glycérol — acide gras insaturé
Glycérol — acide phosphorique-inositol

Les *lécithines*, extraites pour la première fois du jaune d'œuf, sont présentes dans la fraction lipidique de la plupart des tissus (tissu nerveux, pancréas, foie, soja, etc.). Solubles dans le chloroforme, l'éther et l'éthanol chaud, ces substances sont insolubles dans l'acétone d'où leur précipitation à partir d'un extrait chloroformique. En général, les lécithines renferment un acide gras saturé (palmitique ou stéarique) et un acide gras insaturé (oléique), toutefois l'on connaît des lécithines complètement saturées ou complètement insaturées.

Les *céphalines* diffèrent des lécithines par l'amino-alcool et leur insolubilité dans l'éthanol. Elles sont abondantes dans le tissu nerveux, le rein, le muscle, le foie.

Tous ces phosphaminolipides possèdent une *structure bipolaire* nette et forment même des *ions mixtes* par dissociation.

Ex. :

$$(CH_3)_3N^+—CH_2—CH_2—O—\overset{O}{\underset{O^-}{P}}—O—CH_2—CH(—O—CO—C_{17}H_{33})—CH_2—O—CO—C_{17}H_{35}$$

Lécithine

$$\overset{+}{H_3N}(^-OCC)CH—CH_2—O—\overset{O}{\underset{O^-}{P}}—O—CH_2—CH—CH_2—$$

Phosphatidylsérine

Choline

Phosphate

Glycérol

acide gras insaturé

acide gras saturé

Structure d'une lécithine

Pôle hydrophile

Queue hydrophobe

Queue hydrophobe

Pôle hydrophile

Représentations schématiques d'un phosphoaminolipide

Au contact de l'eau, on observe, avec ces molécules polaires, la formation de structures orientées micellaires et surtout feuilletées. Ces associations, qui sont des auto-assemblages, modifiables réversiblement, sont étudiées afin d'apporter des résultats intéressants relatifs à la structure des membranes cellulaires.

Les principes sur lesquels sont fondées ces associations sont basés sur « la bipolarité » de ces molécules.

L'organisation moléculaire se formant de façon spontanée lorsque l'on verse des phospho-aminolipides à la surface de l'eau est la bicouche lipidique qui ressemble à la couche bimoléculaire de ces molécules dans la membrane cellulaire.

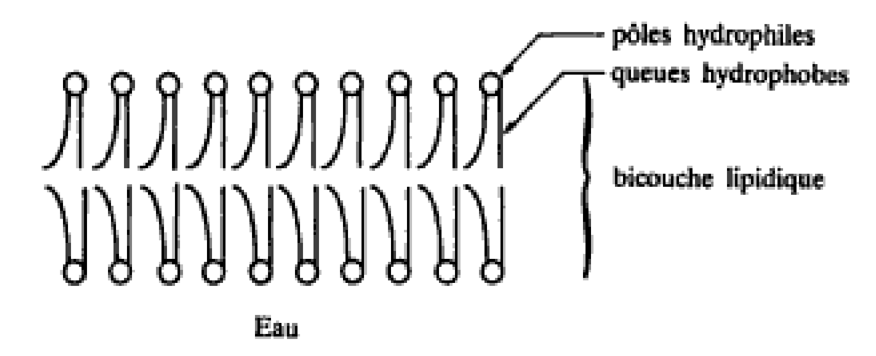


Figure 7.2 Coupe transversale schématique d'une bicouche lipidique.

La structure de la bicouche lipidique est assurée par des liaisons qui stabilisent l'édifice :

— Liaisons entre les queues hydrophobes (interactions hydrophobes et forces de Van der Waals).

— Liaisons entre les pôles hydrophiles et l'eau (liaisons électrostatiques ion-dipôle et dipôle-dipôle).

Ces bicouches lipidiques présentent une certaine fluidité, chacune des couches peut se déplacer par rapport à l'autre sans qu'il puisse y avoir d'échanges entre les constituants de l'une et de l'autre.

Si au lieu de verser les phospholipides à la surface de l'eau on provoque la formation d'une émulsion, l'organisation des phospho-aminolipides est micellaire.

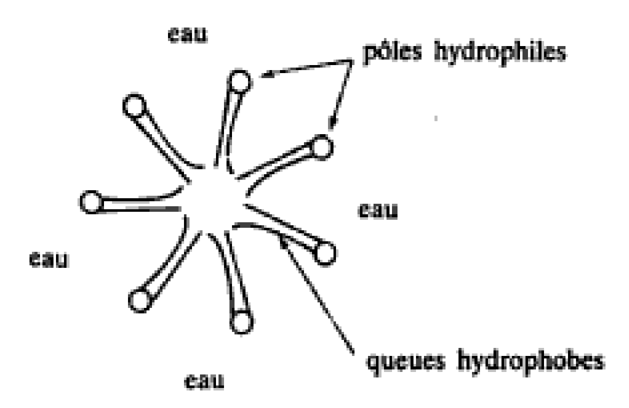


Figure 7.3 Schéma d'une micelle phospholipidique.

Là encore, la stabilité de l'édifice est assurée par des liaisons entre les queues hydrophobes de molécules (interactions hydrophobes et liaisons de Van der Waals) et par des liaisons électrostatiques entre les pôles hydrophiles et l'eau (liaisons ion-dipôle et dipôle-dipôle).

Sous l'action de certains traitements physico-chimiques (sonication en particulier) les bicouches lipidiques peuvent s'organiser en liposomes. Ce sont des vésicules de 250 Å environ de diamètre, formées par une bicouche lipidique délimitant un compartiment interne.

La formation de ces vésicules démontre la propension de la bicouche lipidique à se refermer sur elle-même.

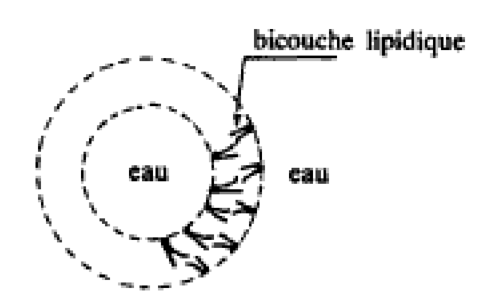


Figure 7.4 Coupe schématique d'un liposome.

Les liposomes sont des modèles artificiels de membranes permettant un certain nombre d'études, en particulier celles relatives à la perméabilité.

Les attaques enzymatiques apportent de nombreuses possibilités pour l'étude des glycérophospho-aminolipides. Les lécithinases ou phospholipases, qui sont des carboxy-estérases, détachent les acides gras de façon spécifique.

La phospholipase A_1, d'origine animale, libère l'acide gras en 1 des phosphoglycéro-aminolipides.

La phospholipase A_2, présente dans les venins de serpents, libère l'acide gras en 2 des lécithines en produisant des lysolécithines (1-acyl glycérophosphorylcholine). Ces substances sont des agents hémolytiques importants.

La phospholipase B, d'origine microbienne et animale, détache l'acide gras en 1 des lysolécithines, en libérant un glycérophosphorylcholine.

La phospholipase C, d'origine bactérienne, scinde le phosphoglycérolipide en diglycéride et ester phosphorique d'un amino-alcool.

La phospholipase D, d'origine végétale, libère l'amino-alcool d'un glycérophospho-aminolipide.

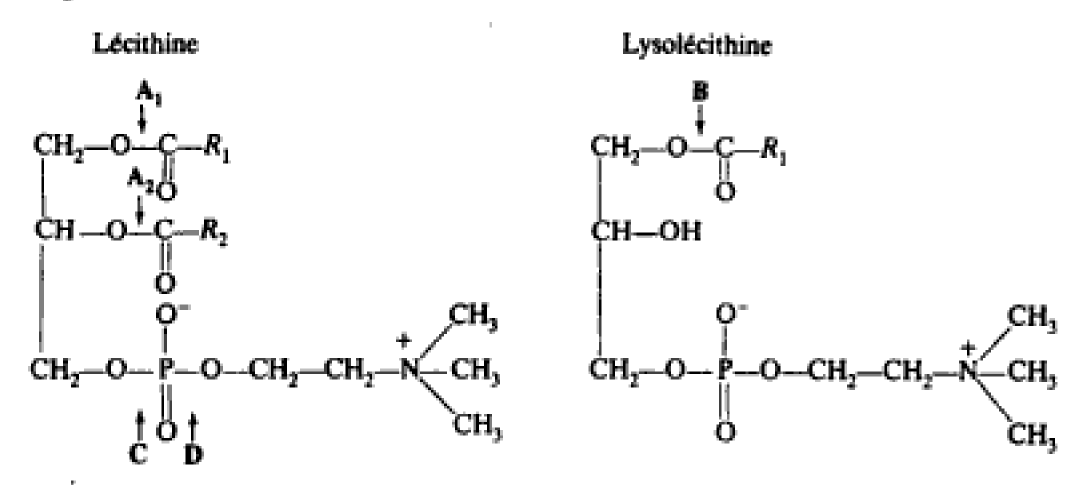


Figure 7.5 Action des phospholipases.

b. Les plasmalogènes

Les plasmalogènes ont été décelés dans le cytoplasme cellulaire par la réaction de Feulgen caractéristique des ADN composant les gènes, d'où leur nom. Cette possibilité de recolorer le réactif de Schiff est une conséquence de leur structure voisine de celle des phosphoaminolipides mais dans laquelle un des acides gras est

remplacé par un aldéhyde aliphatique, palmitique ou stéarique, sous forme énolique. La liaison avec le glycérol est du type éther-oxyde énolique :

$R—CH_2—COOH$	$R—CH_2—CHO$	$R—CH{=}CH—OH$	$R—CH{=}CH—O—CH_2—R'$
Acide gras	*Aldéhyde gras*	*Forme énolique*	*Ether-oxyde énolique*

Traités par la soude, qui saponifie les lécithines et les céphalines, les plasmalogènes sont partiellement dégradés. L'acide gras libéré forme un savon et l'aldéhyde gras s'unit aux fonctions alcool α et β du glycérol par une liaison acétalique. Le terme d'acétalphosphatide créé par Feulgen correspond donc en fait à un artefact.

$$\begin{array}{l} CH_2—O—CH{=}CH—C_{14}H_{29} \\ | \\ CH—O—CO—C_{17}H_{33} \\ | \\ CH_2—O—P(=O)(O^-)—O—CH_2—CH_2—NH_3^+ \end{array} \quad \xrightarrow{+\ NaOH} \quad \begin{array}{l} CH_2—O \\ |\qquad\quad \backslash \\ |\qquad\quad CH—CH_2—C_{14}H_{29} \\ |\qquad\quad / \\ CH—O \\ | \\ CH_2—O—P(=O)(O^-)—O—CH_2—CH_2—NH_3^+ \end{array} \quad + C_{17}H_{33}—COO^-\,Na^+$$

Plasmalogène — Acétalphosphatide — Oléate de sodium

c. Les phosphatidylglycolipides

Ils résultent de la fixation sur la fonction alcool libre d'un diglycéride, de un ou plusieurs résidus osidiques. Ces glyco-lipides sont représentés chez les bactéries et les plantes.

III. LES SPHINGOLIPIDES

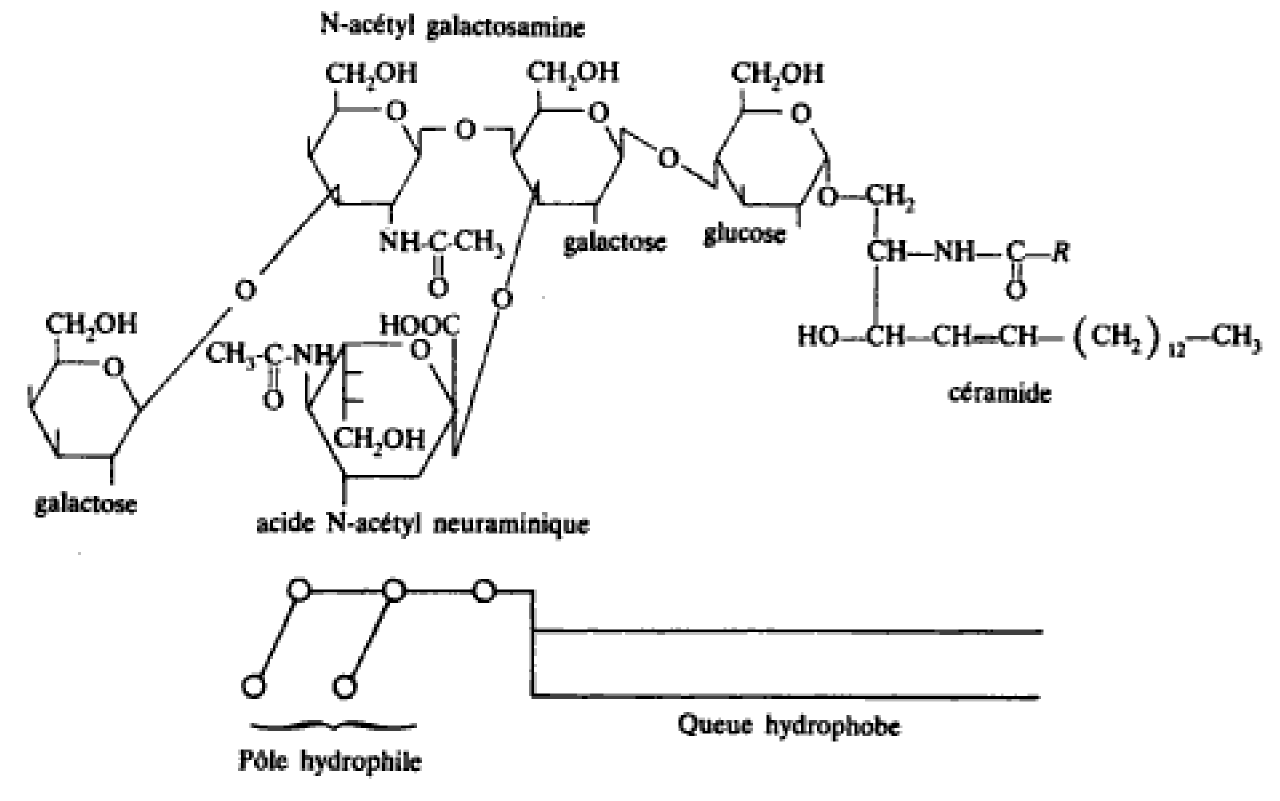
Dans ce groupe, le glycérol est remplacé par la *sphingosine*, aminodiol à 18 atomes de carbone possédant une double liaison.

$$\begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ CH—NH_2 \\ | \\ CHOH—CH{=}CH \\ \qquad\qquad\quad \backslash \\ \qquad\qquad\quad (CH_2)_{12}—CH_3 \end{array} \quad \text{ou} \quad \begin{array}{l} CHOH—CH{=}CH—R \\ | \\ CH—NH_2 \\ | \\ CH_2OH \end{array}$$

Sphingosine

L'acide gras est uni à la sphingosine par une liaison amide et non par une liaison ester.

Les sphingolipides sont particulièrement abondants dans le tissu nerveux, certains d'entre eux s'accumulant au cours de diverses maladies.



Représentation schématique et structure d'un ganglioside
(La structure décrite est celle du ganglioside GM_1)

IV. LES CÉRIDES

Les cérides sont des esters d'acides gras et d'alcools à longue chaîne non ramifiée et à nombre pair d'atomes de carbone : *les alcools gras*.

Ces substances solides, incolores, insolubles dans l'eau, solubles dans le benzène et le chloroforme sont chimiquement inertes. Elles sont saponifiées lentement et résistent à la plupart des réactifs chimiques, d'où leur rôle protecteur. Les cérides constituent la majeure partie des cires (cires végétales, cires d'insectes, huiles de requin, blanc de baleine, etc.).

Ex. : L'ester palmitique de l'alcool cétylique en C_{16} est le constituant principal du blanc de baleine :

$$C_{15}H_{31}—CH_2—O—CO—C_{15}H_{31}$$

Palmitate de cétyle

Le palmitate de myricyle, ester de l'alcool myricylique ($C_{30}H_{61}$—OH), est abondant dans la cire d'abeille.

Les cires bactériennes sont constituées de cérides plus complexes contenant des acides gras spéciaux et parfois des oses, comme c'est le cas pour le « *Cord factor* »

V. LES STÉRIDES

Les stérides sont des esters d'acides gras et de stérols.

Ex. : La lanoline, graisse de la laine de mouton, est un mélange d'oléate, de palmitate et de stéarate de cholestéryle.

Ces substances blanches, cristallines sont répandues dans les deux règnes et présentes dans tous les tissus.

Les LDL (Low Density Lipoproteins) qui représentent une forme importante de transfert du cholestérol, sont riches en linoléate de cholestéryle.

VI. LES LIPIDES ISOPRÉNIQUES

Ces lipides qui, dans l'ancienne classification, étaient classés dans « l'Insaponifiable » sont ainsi appelés car leur structure est souvent une combinaison d'unités isopréniques

$$CH_2{=}C(CH_3){-}CH{=}CH_2 \quad \text{isoprène}$$

Par exemple, le squalène qui est un intermédiaire de la synthèse du cholestérol est formé de six unités isopréniques.

Le squalène

A. Les carbures isopréniques et leurs dérivés

1. LES CAROTÉNOÏDES

Les caroténoïdes, largement répartis dans les deux règnes, sont d'origine végétale. Ce sont des dérivés aliphatiques ou alicycliques de l'isoprène, possédant de nombreuses doubles liaisons conjuguées d'où leur coloration intense, qui va du jaune (xanthophylles) à l'orangé (carotènes) puis au rouge (lycopène) et les nombreuses isoméries cis-trans possibles bien que la plupart des caroténoïdes naturels soit totalement trans ; formes *« all-trans »*.

Les plus importants possèdent 40 atomes de carbone, correspondant à 8 résidus isoprène. Cette longue chaîne carbonée leur confère la liposolubilité.

Les caroténoïdes comprennent :

— les carotènes, carbures d'hydrogène de formule $C_{40}H_{56}$;

— les xanthophylles, dérivées des précédents par l'introduction de fonctions oxygénées (—OH, —COOH, —$COOCH_3$, —CO—) et par un raccourcissement des chaînes dans certains cas.

a. Les carotènes

Les carotènes sont des carbures d'hydrogène en $C_{40}H_{56}$ que l'on peut considérer comme se rattachant au lycopène, pigment rouge de la tomate de structure chimique symétrique.

Lycopène

L'éxtrémité de la chaîne peut se cycliser en un noyau insaturé α ou β-ionone, d'où les possibilités :

A B ou β-ionone, C ou α-ionone

et l'existence de carotènes mono ou bicycliques, symétriques ou non.

***Ex.* :**

Lycopène *A*—chaîne conjuguée—*A*.

α-carotène *B*—chaîne conjuguée—*C*.

β-carotène — *B*—chaîne conjuguée—*B*.
γ-carotène — *A*—chaîne conjuguée—*B*.
δ-carotène — *A*—chaîne conjuguée—*C*.

Le carotène commercial est un mélange des isomères α, β, γ.

Abondants dans la carotte, les carotènes se retrouvent également dans de nombreux végétaux associés ou non aux chlorophylles. Ils sont aussi présents dans le corps jaune de l'ovaire, le jaune d'œuf, la peau, le lait et le sérum sanguin ; le β-carotène étant la forme la plus abondante.

Les caroténoïdes et certains de leurs dérivés interviennent dans la photoréception : perception lumineuse des organes photorécepteurs, vision, transfert d'énergie lumineuse dans les chloroplastes. Ils seraient doués de propriétés antioxygènes et pour les Mammifères les carotènes α, β et γ sont des provitamines *A*.

b. Les xanthophylles

La plus répandue est la lutéine qui est abondante dans les feuilles vertes. C'est le 3-3′ dihydroxy-α-carotène.

2. LA VITAMINE *A*

La *vitamine A_1 ou rétinol 1* (vitamine antixérophtalmique ou axérophtol) est constituée d'un cycle β ionone portant une chaîne latérale formée de deux unités isoprène et terminée par une fonction alcool primaire. Le composé naturel est « *all-trans* ».

Rétinol 1 — Rétinol 2

Le rétinol 1, de formule brute $C_{20}H_{30}O$, est un solide jaune soluble dans les lipides et leurs solvants (vitamine liposoluble). Les solutions présentent une bande d'absorption dans l'ultraviolet dont le maximum est compris entre 325 et 330 nm. Il est estérifiable, très sensible à l'oxydation et développe une coloration bleue en présence du réactif de Carr et Price qui est une solution chloroformique de trichlorure d'antimoine. La teinte bleue obtenue est fugace contrairement à celle donnée par le β-carotène.

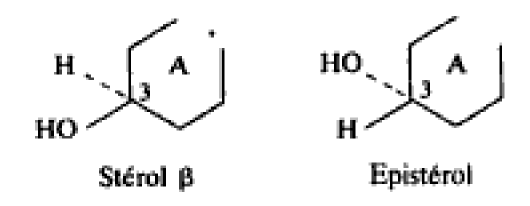
La vitamine A_1 n'existe que dans le règne animal. Présente dans le lait, le beurre et le jaune d'œuf, elle est abondante dans les huiles de foie de poissons et de baleine. Chez l'homme, une *caroténase* localisée dans la paroi intestinale permet la scission entre les carbones 15-15′, avec fixation de deux molécules d'eau, du β-carotène en deux molécules de vitamine *A*. Ce carotène représente donc une provitamine *A*, de même que les carotènes α et γ qui ne fournissent qu'une seule molécule de vitamine *A* par suite de leur structure moléculaire ne renfermant qu'un seul cycle β-ionone.

10 et 13), d'un hydroxyle en 3, d'une chaîne latérale à huit atomes de carbone en 17 et par la présence d'une double liaison dans le cycle *B* en 5-6 qui est notée Δ5.

Cholestérol

Cette formule fait apparaître la présence de 8 carbones asymétriques. Un nombre très élevé d'isomères est donc possible, mais dans les stérols naturels ils sont beaucoup plus réduits. La seule isomérie intéressant le cholestérol porte sur le carbone 3.

Le groupement méthyl fixé sur le carbone 10 étant situé au-dessus du plan de la formule, si l'hydroxyle porté en 3 est en position cis, l'isomère est un stérol cis ou β, dans le cas contraire, c'est un épistérol ou stérol trans, α. Ce que l'on schématise :



Stérol β Epistérol

Le cholestérol appartient à la série cis, c'est le 3 (cis)-hydroxy-5-cholestène.

b. Propriétés physiques

• **Aspect.** — Le cholestérol se présente comme un solide blanc, d'aspect brillant, bien cristallisé. La forme des cristaux varie selon le solvant d'origine : houppes d'aiguilles fines par évaporation d'une solution éthéropétrolique, lamelles avec encoches à partir d'une solution chloroformique (fig. 7.7).

Ces cristaux fondent à 146 °C en donnant un liquide trouble qui s'éclaircit vers 180 °C.

• **Solubilité.** — Le cholestérol est insoluble dans l'eau (molécule apolaire), peu soluble dans l'éthanol froid, mais soluble dans l'éthanol chaud ainsi que dans les solvants des lipides.

• **Pouvoir rotatoire.** — Tous les stérols sont actifs sur la lumière polarisée et la plupart, comme le cholestérol, sont *lévogyres.*

c. Propriétés chimiques

• **Propriétés de la fonction alcool**

— ***Estérification.*** — Le cholestérol est facilement estérifiable. Les esters acétique et benzoïque sont préparés pour l'identification des stérols. Les esters

• **Propriétés de la double liaison**

— ***Réduction.*** — L'hydrogénation en présence de noir de platine, sature la double liaison du cholestérol et aboutit à un alcool secondaire saturé : le dihydrocholestérol ou *cholestanol*. Cette fixation d'hydrogène rend le carbone 5 asymétrique, ce qui crée une nouvelle isomérie α, β.

Le cholestanol ainsi préparé par voie chimique est 5 α alors que la réduction du cholestérol biliaire par les bactéries intestinales conduit à l'isomère 5 β, le *coprostanol* ou *coprostérol* éliminé dans les matières fécales.

La réduction de la fonction alcool par hydrogénation transforme le cholestanol en un carbure saturé le *cholestane*.

Cholestanol Coprostérol Cholestane

— ***Addition d'halogènes.*** — De même que pour les acides gras insaturés, le brome et l'iode peuvent se fixer par addition sur la double liaison du cholestérol. L'indice d'iode est de 65,8.

• **Réactions colorées**

En solution chloroformique les stérols, traités par certains réactifs, développent des colorations diverses ; plusieurs de ces réactions sont utilisées soit au dosage soit à l'identification des stérols. Nous retiendrons deux exemples :

— ***Réaction de Salkowski.*** — Un volume de solution chloroformique de cholestérol est additionné d'un égal volume d'acide sulfurique pur. On obtient après agitation deux couches superposées, une couche chloroformique rouge sang, une couche sulfurique brune à fluorescence verte.

— ***Réaction de Liebermann-Burchard.*** — La solution chloroformique de cholestérol est cette fois additionnée d'un égal volume d'anhydride acétique et de 2 à 3 gouttes d'acide sulfurique pur. Après agitation il apparaît une coloration violacée fugace, virant au bleu puis au vert et dont l'intensité est maximum après trente minutes à la température ambiante.

De telles réactions colorées sont données par tous les stéroïdes possédant un hydroxyle en 3 et une double liaison en 5-6, les colorations variant légèrement selon le stéroïde. Leur mécanisme dans lequel intervient une déshydratation est complexe et mal connu.

d. Rôle biologique du cholestérol

Le cholestérol est d'abord le précurseur de nombreuses substances stéroïdes : hormones stéroïdes sexuelles et corticosurrénaliennes, acides et sels biliaires,

vitamine D_3. Il intervient aussi dans le métabolisme de l'eau en réglant l'hydrophilie du cytoplasme pour lequel on observe un certain parallélisme entre sa teneur en eau et son coefficient lipocytique ou rapport cholestérol/acides gras.

Enfin le cholestérol libre possède un pouvoir antihémolytique et un rôle antitoxique vis-à-vis de certaines toxines bactériennes.

Une mauvaise élimination biliaire ou des dérèglements du métabolisme conduisent à des troubles parfois graves : formation de calculs vésiculaires, dépôt dans certains tissus, la paroi des vaisseaux sanguins en particulier. Ces dépôts, de cholestérol plus ou moins associé à des lipides et secondairement à des substances minérales, sont responsables de l'athérosclérose et de ses conséquences dont l'infarctus du myocarde.

Le cholestérol est, en outre, un lipide membranaire des cellules eucaryotes ; en revanche, la plupart des cellules procaryotes en sont dépourvues. Le cholestérol confère aux membranes plasmiques une certaine fluidité, cette molécule est moins abondante dans les membranes des organites

Le cholestérol s'oriente dans la bicouche lipidique comme les autres constituants lipidiques, pôle hydrophile et queue hydrophobe du cholestérol orientés comme les pôles hydrophiles et queues hydrophobes des phosphoaminoglycerolipides, sphingolipides et glycolipides.

2. LES PRINCIPAUX STÉROLS

Tous les stérols sont des alcools secondaires, solides, saturés ou non, possédant un noyau polycyclique dérivé du phénanthrène. Ils se différencient les uns des autres par le nombre et la position des doubles liaisons dans le noyau et par la structure de la chaîne latérale.

Les stérols ont une répartition très générale, seules les bactéries en sont pratiquement dépourvues. D'après l'origine biologique on distingue : les zoostérols ou stérols animaux et les phytostérols ou stérols végétaux.

a. Les zoostérols

Ils comprennent :

• Le **cholestérol,** principal stérol des Vertébrés.

• Le **coprostérol,** dérivé du précédent par réduction enzymatique. Ce stérol saturé ne fixe pas d'iode, ne donne qu'une très faible réaction de Liebermann mais précipite par le digitonoside (hydroxyle en 3 β). C'est l'un des rares stérols naturels dextrogyre et de la série 5 β.

• Le **7-déhydrocholestérol** ne diffère du cholestérol, auquel il est généralement associé, que par l'existence d'une seconde double liaison en 7-8. Présent dans de nombreux tissus, ce dérivé du cholestérol, est le précurseur direct de la vitamine D_3 p. 253).

• Les **stérols de la lanoline.** — L'insaponifiable de la lanoline renferme 25 % de cholestérol et 20 % d'un mélange de deux stérols : le *lanostérol,* à deux doubles liaisons, et l'*agnostérol* qui représente l'une des étapes de la biosynthèse du cholestérol.

b. Les phytostérols

Les plus répandus sont :

• L'**ergostérol,** qui est le plus important des stérols d'origine végétale. Découvert dans l'Ergot du seigle, il a été, depuis, caractérisé dans divers organismes végétaux (levures, moisissures, algues) et animaux (escargot, ver de terre, peau humaine, etc.).

Il diffère du cholestérol par la présence d'une seconde double liaison dans le noyau, en 7-8, et par la chaîne latérale insaturée à 9 atomes de carbone :

Ergostérol $C_{28}H_{43}OH$

C'est le précurseur de la vitamine D_2 (p. 253).

• Le **stigmastérol** du Soja, le fucostérol des algues brunes, le zymostérol de la levure de bière, etc. qui accompagnent l'ergostérol dans les diverses espèces végétales.

3. LES DÉRIVÉS DES STÉROLS

a. Les acides biliaires

En plus des sels minéraux, la bile renferme environ 1 % de sels alcalins d'acides à structure stérolique : les acides biliaires, qui représentent les produits les plus abondants du catabolisme du cholestérol.

α) *STRUCTURE*

Les acides dérivés du cholestérol : *acides cholique, chénodésoxycholique, désoxycholique et lithocholique* sont tous constitués par un noyau stérane porteur des deux groupements méthyle, d'une chaîne latérale de 5 atomes de carbone terminée par un carboxyle et d'un hydroxyle en 3 sous la forme α. Ils diffèrent les uns des autres par la présence ou l'absence d'autres hydroxyles en 7 et 12, toujours en position α.

Acide cholique

Dans le foie où ils sont synthétisés, ces acides sont ensuite conjugués par amidification, principalement à la glycine et secondairement à la taurine. Ces formes conjuguées hydrosolubles sont éliminées dans la bile à l'état de sels de sodium.

$+ H_3^+N—CH_2—COO^-$
Glycine

$R—\sim COOH$ → $R\sim CONH—CH_2—COO^-$
Acide cholique → Glycocholate

$+ H_3^+N—CH_2—CH_2—SO_3$
Taurine

→ $R\sim CONH—CH_2—CH_2—SO_3^-$
Taurocholate

β) *PROPRIÉTÉS*

Les acides biliaires sont fortement tensioactifs. L'abaissement de tension superficielle qui résulte de leur présence a de nombreuses conséquences et applications.

• Les sels biliaires *favorisent la digestion et l'absorption des lipides* en les émulsionnant. Ils activent les lipases. La majeure partie d'entre eux est réabsorbée au niveau de l'intestin et retourne au foie pour être de nouveau excrétée (cycle entérohépatique).

• Les sels biliaires sont *hémolysants* mais la combinaison avec la sérumalbumine (forme de transport) diminue cette action.

• Les sels biliaires ont un *rôle antiseptique* vis-à-vis de certains germes.

• La *recherche de leur présence anormale* dans l'urine par la fleur de soufre est l'application directe de l'action sur la tension superficielle.

Parmi les autres caractéristiques nous citerons : le spectre d'absorption ultraviolet et la fluorescence bleue des solutions sulfuriques d'acides biliaires ; la réaction de Pettenkofer qui est une condensation des acides biliaires avec l'hydroxyméthylfurfural, préparé par action de l'acide sulfurique pur sur le saccharose ou le fructose. Le produit obtenu présente une coloration rouge intense.

b. Les calciférols ou vitamines D

Le groupe des vitamines *D*, antirachitiques, comprend deux substances naturelles abondantes dans l'insaponifiable des huiles de foie de poissons, la *vitamine* D_2 ou *ergocalciférol* et la *vitamine* D_3 ou *cholécalciférol.*

Ces substances, qui ne sont pas de véritables stéroïdes par suite de l'ouverture du cycle *B* du noyau stérane, possèdent trois doubles liaisons conjuguées.

Les calciférols sont solubles dans les lipides (vitamines liposolubles), l'éthanol et les solvants des lipides ; leurs solutions sont dextrogyres et absorbent dans l'ultraviolet. Ils sont estérifiables, ne précipitent pas par le digitonoside, donnent une réaction de Liebermann affaiblie et une coloration jaune orangé avec le trichlorure d'antimoine (réaction de Carr et Price).

La *vitamine* D_2 dérive de l'ergostérol à la suite d'une irradiation ultraviolette et d'une faible élévation de température. Le précalciférol est l'étape intermédiaire dont l'irradiation peut conduire à d'autres stérols, certains étant d'ailleurs toxiques.

Ergostérol ⇄ (Irradiation UV) Précalciférol ⇄ (Elévation de température) Ergocalciférol

Précalciférol → (Irradiation UV) Lumistérol, Tachystérol

La *vitamine* D_3 dérive du 7-déhydrocholestérol présent dans la peau. L'irradiation ultraviolette nécessaire à la transformation en cholécalciférol peut être réalisée par la lumière solaire ; d'où les bienfaits des cures solaires et des traitements ultraviolets pour le rachitisme.

7-Déhydrocholestérol → (Irradiation UV) Cholécalciférol

c. Les hormones stéroïdes

La structure de ces hormones peut être rattachée à celle du cholestérol par amputation de la chaîne latérale au niveau du carbone 17 ou 21 et par modification du nombre et de la place des doubles liaisons. Elles se répartissent en trois séries d'après le nombre d'atomes de carbone contenus dans la molécule et chaque série correspond à un carbure saturé synthétique dérivé du noyau stérane. Ces carbures sont : l'*œstrane* à 18 carbones, l'*andostrane* à 19 carbones et le *prégnane* à 21 carbones.

Les hormones stéroïdes sont sécrétées à la fois par le cortex des glandes surrénales, les glandes génitales (follicules et corps jaunes pour l'ovaire, glande interstitielle pour le testicule) et le placenta. Les unes ont plusieurs origines glandulaires, les autres sont assez spécifiques d'une glande. Insolubles dans l'eau, les stéroïdes circulent dans le sang sous forme de complexes avec les lipoprotéines plasmatiques. Au niveau du foie et du rein les formes actives et les produits de leur catabolisme sont conjugués (sulfoconjugaison et glucuroconjugaison) puis éliminés dans l'urine.

Ces composés sont très nombreux et nous limiterons notre étude à un échantillonnage des principaux représentants de chaque groupe.

α) *LES HORMONES STÉROÏDES À 18 ATOMES DE CARBONE*

Les stéroïdes de ce groupe sont formés d'un noyau dans lequel le cycle *A* est benzénique et porte un hydroxyle phénolique en 3. Ce sont des *phénolstéroïdes,* solubles en milieu alcalin.

Ex. : L'*œstrone* (1), ou *folliculine,* porte une fonction cétone en 17, c'est un 17-cétostéroïde acide.

L'*œstradiol* (1) et l'*œstriol* (1) ne portent pas de fonction cétone.

Œstrone — Œstradiol — Œstriol

Ces hormones dites ***œstrogènes*** déterminent les caractères sexuels secondaires femelles et déclenchent la prolifération de la muqueuse utérine durant la première phase (folliculaire ou œstrale) du cycle menstruel humain.

Elles sont sécrétées non seulement par le follicule ovarien mais aussi par le testicule, la corticosurrénale et le placenta.

β) *LES HORMONES STÉROÏDES À 19 ATOMES DE CARBONE*

Le noyau stérane porte cette fois deux groupements méthyle et très souvent une fonction cétone en 17. Ce sont des 17-*cétostéroïdes neutres,* toutefois la *testostérone* qui est la véritable hormone mâle fait exception. Sa forme d'excrétion, l'*androstérone,* très active, est par contre de ce type.

Testostérone — Androstérone (5 α)

Ces hormones ***androgènes,*** sécrétées par le testicule et la corticosurrénale, contrôlent le développement des caractères sexuels secondaires mâles, la maturation des spermatozoïdes et l'activité des glandes génitales accessoires.

(1) Ces hormones sont encore orthographiées : estrone, estradiol, estriol.

γ) *LES HORMONES STÉROÏDES À 21 ATOMES DE CARBONE*

Elles possèdent une chaîne latérale à 2 atomes de carbone en position 17 et sont réparties en deux séries selon l'origine.

— Les *hormones corticosurrénaliennes,* elles-mêmes subdivisées en :

• **Glycocorticoïdes.** — Les hormones de ce groupe ont une activité anti-inflammatoire et provoquent l'hyperglycémie. De plus elles accélèrent le catabolisme des graisses et la conversion des acides aminés glycoformateurs en glycogène.

Comme caractéristiques structurales de ce groupe il faut signaler la présence d'une chaîne α-cétolique —CO—CH_2OH en 17, d'atomes d'oxygène en 3 et 11 et d'une double liaison en 4-5 dans le cycle *A*.

Ex. : L'*hydrocortisone* ou *cortisol,* la *corticostérone* et la *cortisone* qui est un produit du catabolisme :

Cortisol Corticostérone Cortisone

• **Minéralocorticoïdes.** — Les minéralocorticoïdes assurent la régulation du métabolisme des électrolytes. Leur structure est voisine de celle des glycocorticoïdes.

Ex. : La *désoxy-11-corticostérone* et l'*aldostérone* ou *électrocortine* beaucoup plus active.

Aldostérone Désoxy-11-corticostérone

— Les *hormones ovariennes* dites encore lutéiniques ou *gestagènes* sont sécrétées par les corps jaunes ovariens.

La principale hormone de ce groupe est la *progestérone* dérivée du cholestérol et elle-même précurseur des corticoïdes, des androgènes et indirectement des œstrogènes.

2. LES VITAMINES *K*

• Les **vitamines *K*** (vitamines de coagulation), d'origine végétale, ont une structure naphtoquinonique substituée par une chaîne latérale isoprénique, plus ou moins longue et plus ou moins saturée. La vitamine K_1 est encore appelée phylloquinone.

CH_3

Chaine latérale

Méthyl naphtoquinone

Vitamine K

3. LE COENZYME *Q* OU UBIQUINONE

C'est un transporteur d'électrons de la chaîne respiratoire, dont la longue chaîne hydrophobe est constituée de $n = 10$ unités isopréniques chez les mammifères.

$$[CH_2{-}CH{=}C(CH_3){-}CH_2]_n{-}H$$

Ubiquinone

Chez les plantes, la chaîne respiratoire contient aussi un transporteur d'électrons liposuble, appelé plastiquinone qui est de structure semblable à l'ubiquinone.

Les associations moléculaires lipolipidiques et lipoprotéiques

Les lipides sont en majeure partie hydrophobes, l'eau solvant ne peut interagir qu'avec les pôles hydrophiles des molécules.

Les lipides cellulaires et les lipides circulants sont généralement associés à des

Les molécules distribuées à la surface sont :

— les apoprotéines dont les parties hydrophiles sont orientées vers l'extérieur et les parties hydrophobes vers le centre ;

— le cholestérol libre dont l'hydroxyle est tourné vers la surface et la partie hydrophobe de la molécule vers le noyau ;

— les phospholipides, qui présentent leurs pôles hydrophiles vers l'extérieur et leurs chaînes hydrophobes vers l'intérieur.

Le noyau est constitué des triglycérides, du cholestérol estérifié et des lipides isopréniques.

4. RÔLE DES LIPOPROTÉINES

Les lipoprotéines représentent la seule forme de transport des lipides de l'organisme.

Les chylomicrons apparaissent dans le sérum en période de digestion, riches en triglycérides, ils sont dus à l'absorption intestinale des graisses.

Les VLDL assurent le transport des lipides, surtout des triglycérides vers les tissus.

Les LDL chargées en cholestérol pénètrent dans les cellules.

Les HDL drainent le cholestérol des tissus vers le foie où il est éliminé.

II. LES MEMBRANES BIOLOGIQUES

La bicouche lipidique, dont l'existence a été évoquée aux pages 236 et 237, est la structure de base universelle existant dans toutes les membranes.

Elle est constituée de deux couches lipidiques fluides formées de lipides polaires et de cholestérol (chez les Eucaryotes) dans lesquelles et sur lesquelles sont associées des protéines.

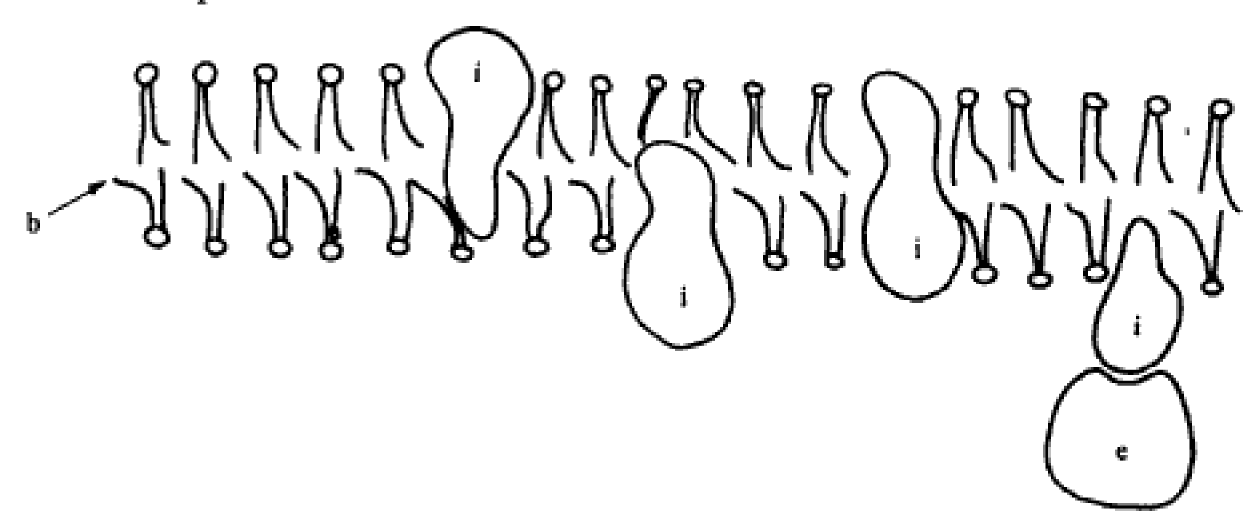


Figure 7.9 Structure schématique de la membrane :
b : bicouche lipidique, i : protéines intrinsèques, e : protéines extrinsèques.

Quand les protéines sont fortement imbriquées dans la bicouche, on les appelle intrinsèques, quand elles y sont accolées on les qualifie d'extrinsèques.

La nature des liaisons assurant la stabilité de l'ensemble varie selon le site : les groupements polaires des protéines sont associés aux pôles hydrophiles des molécules de la bicouche lipidique par des liaisons électrostatiques, en revanche les groupements apolaires des protéines sont associés aux queues hydrophobes des lipides par des interactions hydrophobes et des liaisons de Van der Waals.

Les lipides de la bicouche n'ont pas seulement un rôle structural mais peuvent intervenir dans le métabolisme en cédant des acides gras libérés par des phospholipases.

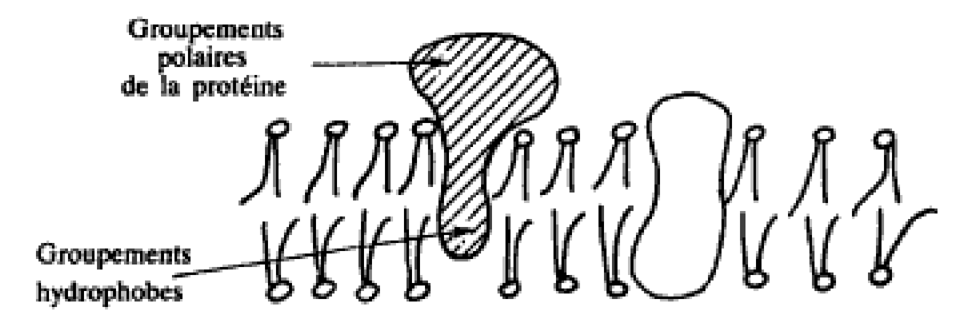


Figure 7.10 Liaisons lipides-protéines.

Méthodes d'analyse des lipides

I. L'EXTRACTION DES LIPIDES

L'*extraction* des lipides de la matière vivante est généralement réalisée par un mélange de solvants associant l'action solvante de l'un (éther, chloroforme, méthylal) à l'action dissociante de l'autre (méthanol, éthanol, acétone). Le matériel à traiter est déshydraté ou lyophilisé et réduit en fines particules. L'opération peut être conduite à froid ou à chaud, par simple contact, en ampoules à décanter, ou par multiples contacts, à l'aide d'extracteurs du type Soxhlet ou Kumagawa.

La *purification* de l'extrait brut par dissolution sélective permet d'éliminer les sels minéraux, les oses, les acides aminés, etc., qui ont été entraînés. Cette séparation est délicate, ou bien elle est incomplète, ou bien elle s'accompagne de la perte d'une partie des lipides. L'extrait lipidique total ainsi obtenu peut servir, après évaporation des solvants, au dosage pondéral.

II. LE FRACTIONNEMENT DES LIPIDES

• Le **fractionnement basé sur les différences de solubilités** donne fréquemment des résultats imparfaits par suite de phénomènes de solubilisation réciproque très importants. Par exemple, les phosphatides insolubles dans l'acétone sont partiellement solubles dans une solution acétonique de glycérides. La technique, adaptée à chaque cas particulier, est généralement longue et laborieuse et les résultats non quantitatifs.

Schématiquement, en traitant un extrait lipidique total successivement par le chloroforme, l'acétone, l'éther et l'éthanol, on peut le séparer en plusieurs fractions :

— lipides acétonosolubles (glycérides, stérides, cérides, acides et alcools gras, stérols, carbures) ;

— lipides solubles dans l'éther et l'éthanol (lécithines) ;

— lipides solubles dans l'éther mais insolubles dans l'éthanol (céphalines, inositides, etc.) ;

— lipides insolubles dans l'éther (sphingomyélines, cérébrosides, gangliosides).

Extraction et fractionnement peuvent être réalisés en un seul temps à l'aide d'une succession de solvants.

• Le **fractionnement chromatographique** sur papier, sur couche mince ou sur colonne de gel de silice donne de meilleurs résultats mais ne permet pas de traiter des quantités très importantes d'extrait : d'où la rareté des lipides purs, correspondant à une seule espèce chimique.

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) et l'utilisation de phases stationnaires réverses ont accru le pouvoir de résolution d'une séparation chromatographique de lipides.

III. L'ANALYSE DES LIPIDES

• L'**analyse des glycérides** peut être réalisée par détermination des différents indices, d'acide, de saponification, d'iode, de peroxydes, etc. qui fournissent des renseignements partiels sur la composition en acides gras.

• L'**analyse d'un extrait lipidique** nécessite une saponification permettant de séparer : l'insaponifiable insoluble dans l'eau en milieu alcalin mais soluble dans l'éther et l'éther de pétrole, les acides gras solubles dans l'eau en milieu alcalin (savons) mais insolubles en milieu acide et extractibles par l'éther et la fraction

hydrosoluble qui peut contenir du glycérol, des amino-alcools, de l'acide phosphorique, etc.

Le fractionnement des acides gras est de nos jours réalisé par chromatographie sur papier, par chromatographie en phase gazeuse et en HPLC. La chromatographie en phase gazeuse appliquée aux acides gras ou à leurs esters méthyliques permet d'analyser quantitativement, et avec précision, des mélanges très complexes.

L'analyse de l'insaponifiable et de la fraction hydrosoluble met en jeu des méthodes particulières (dosage du cholestérol, dosage du glycérol, dosage de la choline, etc.).

Enfin le dosage de l'azote et du phosphore est souvent utilisé pour déterminer la position systématique d'un lipide complexe d'après l'évaluation du rapport N/P.

Hidden page

INDEX ALPHABÉTIQUE

BIOSCIENCES ET TECHNIQUES

Biochimie structurale

Cet ouvrage s'adresse aux étudiants du premier cycle universitaire : BTS, DUT, DEUG..., ainsi, il aborde les structures et les propriétés physico-chimiques des molécules rencontrées en biochimie, de façon à favoriser ensuite la compréhension de leur rôle biologique de constituant de la matière vivante ou de catalyseur des réactions du métabolisme.

Par ailleurs, les auteurs insistent sur les propriétés qui interviennent dans l'analyse biochimique : dosage, séparation et caractérisation. Ce qui rend ce livre particulièrement utile aux étudiants préparant un diplôme technologique.

Cl. Audigié†
F. Zonszain†



ISBN : 2-7040-0655-5